

Résumés des projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques

Deuxième semestre 2019 (du 1er juillet 2019 au 31 décembre 2019)

12870 Les cellules lymphoïdes innées sont des cellules productrices de cytokines ayant la même morphologie que les lymphocytes T ou B, mais dépourvues de récepteurs réarrangés. Ces cellules récemment découvertes jouent des rôles importants dans les réponses aux pathogènes et notamment dans les muqueuses. Cette population est hétérogène, classée en plusieurs types selon les cytokines produites. Une population, notamment, produit l'interleukine 22 (IL-22) qui agit spécifiquement sur les épithéliums. L'IL-22 contribue à la réparation des muqueuses endommagées et régule nos interactions avec le microbiote.

L'origine évolutive de ces cellules est inconnue. A part chez l'homme, elles n'ont encore été identifiées que chez la souris. Le gène *il22* est clairement présent chez les poissons, mais on ne sait pas quelles cellules l'expriment. Ce projet vise à déterminer si des cellules lymphoïdes innées existent chez un petit poisson modèle, le Danio zébré, si certaines produisent de l'IL-22, et si le rôle de cette cytokine est conservé dans cette espèce. Ce projet permettra de mieux comprendre l'évolution de cette population cellulaire importante, et fournir de nouveaux outils permettant de parfois remplacer les mammifères par des animaux plus simples pour étudier ces cellules, avec des approches plus raffinées, comme l'imagerie intravitale non-invasive.

Ce projet requiert l'emploi de 1941 danios zébrés adultes ou juvéniles et de 504 larves. Il comprend 5 procédures, deux de classe de sévérité « légère » et trois « modérée ». Il requiert l'emploi de poissons immunodéficients, qui devraient être plus sensibles aux infections lors de leur élevage.

L'étude des propriétés de ces cellules va nécessiter l'injection de préparations induisant des réponses inflammatoires fortes, mais de courte durée. Par ailleurs, afin d'évaluer la réparation des muqueuses, il sera nécessaire d'appliquer un traitement causant une inflammation digestive pendant quelques jours.

Ce projet respecte la règle des 3R, utilisant un vertébré inférieur, des nombres d'animaux choisis les plus faibles possibles tout en permettant de tester les hypothèses et vérifier la répétabilité des expériences, et combinant autant que possible les méthodes d'analyses afin d'obtenir le maximum d'informations à partir des animaux utilisés. Les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance grâce à la mise en place de points limites. Les manipulations nécessitant une immobilisation seront conduites sous anesthésie.

12871 Près de 400 000 nouveaux cas de cancers en France ont été répertoriés en 2017, touchant 214 000 hommes et 185 500 femmes. De nombreux cancers sont résistants aux traitements conventionnels de types chimiothérapie ou radiothérapie et les rechutes dues à la formation de métastases sont importantes. La recherche d'autres traitements pour ces cancers est donc un défi important. De nombreuses études ont démontré qu'il existe un lien très fort entre l'inflammation et le cancer. Dans les conditions physiologiques, l'inflammation est un processus bénéfique qui, à la suite d'une infection ou d'une blessure, permet à l'organisme d'éliminer les pathogènes et de réparer les tissus endommagés. Si le système immunitaire joue un rôle dans le contrôle de l'évolution des tumeurs, dans certains cas les cellules tumorales peuvent détourner les médiateurs de l'inflammation sécrétés par les cellules du système immunitaire pour promouvoir leur croissance et leur vascularisation. Notre laboratoire étudie le rôle de médiateurs sécrétés par les cellules du système immunitaire, les cytokines pro-inflammatoires, afin de mieux comprendre leurs implications

dans la croissance tumorale. Nous avons montré sur des modèles de culture cellulaire qu'une de ces cytokines, l'oncostatine M (OSM) est capable de moduler l'activation, la migration et la différenciation cellulaire, qui sont des étapes fondamentales dans les mécanismes de développement tumoral et de formation des métastases. Nous souhaitons maintenant étudier le rôle joué par cette cytokine dans le développement tumoral *in vivo*. Nous avons déjà modélisé, chez la souris, le développement des cancers par injections de lignées tumorales en sous-cutané et nous allons maintenant étudier l'implication de l'OSM dans le développement tumoral. Un maximum de 4032 souris sera nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet. Ces travaux permettront de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des cancers. En effet, les thérapies anti-cytokines, à l'aide d'anticorps bloquants par exemple, sont actuellement en plein essor pour de nombreuses pathologies inflammatoires et tumorales et donnent des résultats remarquables.

La « règle des 3 R » a été prise en compte.

Remplacer : Cette étude ne peut pas être remplacée car elle fait suite à des études réalisées *in vitro*. Il est maintenant indispensable de prendre en compte le microenvironnement global des cellules tumorales *in vivo*.

Réduire : Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique.

Raffiner : La notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation et d'élevage qui sont optimisées (hébergement en groupe, nid, enrichissement, sédation et/ou analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures. Des points limites précoces et des critères d'arrêt ont été définis.

12872 Les dysfonctions et faiblesses musculaires, causées par des maladies héréditaires, le cancer ou le vieillissement, comptent parmi les problèmes de santé publique les plus dévastateurs. Le principal obstacle au développement de thérapies musculaires est de parvenir à délivrer les molécules thérapeutiques aux muscles. En effet, les muscles squelettiques représentent 40% de la masse corporelle et sont répartis dans tout le corps : un traitement doit être capable de cibler efficacement tous les muscles touchés. Ce projet vise à développer une nouvelle stratégie de délivrance de molécules thérapeutiques aux muscles. La stratégie cible spécifiquement les muscles, mais utilise des cellules sanguines, qui sont naturellement capables de circuler dans tout le corps et de pénétrer dans les muscles enflammés. Cette stratégie novatrice pourrait constituer une solution systémique pour surmonter le problème de la délivrance musculaire.

Il est nécessaire de tester la faisabilité et l'innocuité de cette stratégie dans un modèle préclinique. La souris est utilisée ici comme organisme modèle car son organisation musculaire est très similaire à l'homme et elle offre des avantages techniques essentiels. Le projet est divisé en 5 procédures et utilise 700 souris. Divers types de cellules sanguines exprimant des constructions génétiques thérapeutiques sont soit injectées, soit produites par greffe de moelle osseuse, puis l'efficacité de délivrance des molécules thérapeutiques à des muscles lésés est évaluée dans une lignée sauvage ou dans un modèle de myopathie.

Les 3R sont appliqués notamment par les actions suivantes :

Remplacer : Une preuve de principe validant la stratégie a déjà été obtenue *in vitro*, et les constructions génétiques thérapeutiques sont toutes validées *in vitro*. Le projet vise maintenant à déterminer si une délivrance systémique de cellules sanguines modifiées peut permettre d'atteindre les muscles, ce qui doit nécessairement être réalisé *in vivo* chez l'animal.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux, des témoins sont réalisés du côté controlatéral du même animal. De plus, l'imagerie de bioluminescence *in vivo* permet d'observer la progression de l'expérience sans avoir à mettre à mort l'animal, pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Raffiner : Afin de réduire la souffrance des animaux, des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pour toute procédure susceptible de causer du stress ou de la douleur à l'animal. Les souris

sont surveillées quotidiennement après les manipulations et des aliments spéciaux sont utilisés afin de faciliter l'accès des animaux à la nourriture pendant leur rétablissement après manipulation. Les souris modèles de myopathie sont mises à mort avant la manifestation physiologique de tout phénotype dommageable. Des signes de maladie, de perte de poids, de souffrance, de lésions ou de détérioration de l'état de santé général constituent les points limites où les souris sont mises à mort.

12873 Contexte : En France, l'infarctus du myocarde touche 100000 personnes par an. C'est une maladie grave et invalidante provoquée par l'obstruction d'une artère du cœur. Le seul traitement possible est de déboucher l'artère occluse. Bien qu'indispensable, cela provoque des lésions supplémentaires incluant la mort des cellules du cœur et une dysfonction cardiaque. Comprendre les mécanismes sous-jacents constitue donc un grand challenge pour les scientifiques. Au cours des dernières décennies, la prise en charge des patients souffrant d'un infarctus a commencé à s'améliorer, grâce à la meilleure compréhension des mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion, en parallèle du développement de stratégies de cardioprotection. Néanmoins, l'infarctus myocardique reste une maladie fréquente avec un devenir incertain, ce qui confirme la nécessité de constantes recherches pour mieux cibler les solutions thérapeutiques.

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

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

Nous étudierons ainsi l'effet de l'ischémie-reperfusion cardiaque sur les pompes SERCA. Par ailleurs, nous chercherons à mieux comprendre l'impact de l'altération du passage du calcium du réticulum vers la mitochondrie à l'aide d'infection virale des cellules du cœur avec des outils génétiques d'imagerie.

Ce projet comporte donc 5 procédures pour un total maximum de 273 souris sur 3 ans.

Conformité de la règle des 3R :

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

Réduire : Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit 273 animaux sur 3 ans. Par ailleurs, la procédure 2 sur la fonction cardiaque ne sera réalisée que si un effet protecteur est observé dans la procédure 1 par mesure de la taille d'infarctus.

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

santé de l'animal pour ajuster les soins et l'analgésie apportés à l'animal, ou encore pour mettre fin au protocole en concertation avec le vétérinaire et le chef de projet.

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

12874 Le développement de la nanomédecine permet d'envisager des traitements anticancéreux mieux ciblés, plus efficaces et avec de moindres effets secondaires par rapport aux traitements conventionnels. L'utilisation de nanoparticules activables à distance (lumière, magnétisme) permet de contrôler l'action thérapeutique à la fois dans le temps et dans l'espace. Parmi ces nanomatériaux thérapeutiques, une classe très prometteuse est celle des sulfures de cuivre, qui, sous rayonnement laser peuvent à la fois générer de la chaleur, et créer des espèces réactives à l'oxygène cytotoxiques (et donc thérapeutiques). Alors que le développement de ces nouvelles nano-thérapies est en plein essor, des études systématiques de leur devenir au long-terme dans l'organisme, après avoir achevé leur mission thérapeutique, sont encore manquantes. Il est pourtant absolument nécessaire de comprendre la dégradation et l'élimination de ces nanoparticules dans l'organisme. Le projet propose l'évaluation de la biodistribution de différentes compositions de nanoparticules (cœur d'oxyde de fer ou couche de sulfure de cuivre ou l'hybride de l'ensemble) combinée avec l'étude de leur transformation chez la souris, dans les différents organes. L'objectif final est d'établir l'innocuité, la bio-persistance et le devenir à long terme de ces nanoparticules à visées thérapeutiques.

Cette évaluation sera réalisée sur un modèle murin après injection intraveineuse des nanoparticules.

Toutes les expériences *in vivo* seront gouvernées par les principes de la règle des 3R.

Remplacer : Les premières évaluations des nanoparticules seront faites systématiquement *in vitro* sur des lignées cellulaires ou sur des tissus modèles pour permettre de remplacer totalement les animaux dans tous les cas où un effet net de toxicité sera mesuré *in vitro*.

Réduire : Un nombre minimal mais statistiquement correct d'animaux par groupe sera choisi pour réduire le nombre total d'animaux utilisés. De plus, les contrôles seront mutualisés entre les différentes expériences, et les analyses *ex vivo* seront réalisées pour pouvoir faire toutes les mesures nécessaires (techniques différentes) sur un même organe. En prenant en compte toutes ces considérations, le nombre d'animaux nécessaires à cette étude est 640.

Raffiner : Afin de réduire la douleur et la détresse des animaux, une anesthésie par voie gazeuse sera toujours pratiquée pour chaque procédure, et l'hébergement, les soins et l'ensemble des procédures expérimentales sur les animaux seront effectués dans le respect du bien-être animal avec la définition de points limites au-delà desquels l'expérience sera interrompue.

12875 La tuberculose (TB), causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), est responsable de 1,7 million de décès dans le monde. Les hommes sont touchés environ deux fois plus que les femmes, à la fois en termes de cas et de décès. A l'instar d'autres pathologies infectieuses ou auto-immunes, cette susceptibilité différentielle entre homme et femme à la TB repose, au moins en partie, sur des caractéristiques biologiques spécifiques notamment immunologiques. L'objectif de notre projet est d'explorer le rôle et les mécanismes d'action des hormones sexuelles dans la résistance/sensibilité à la TB. Sur la base des travaux antérieurs et de nos données préliminaires, le projet abordera les 2 questions suivantes: 1) Quels sont les mécanismes immunologiques de la susceptibilité différentielle lors d'une infection par *M. tuberculosis* chez la souris ? 2) Dans quelle mesure ces mécanismes s'appliquent-ils à l'humain ? Pour répondre à ces questions, nous utiliserons différents modèles. Tout d'abord, des souris mâles et femelles sensibles ou résistantes à la TB seront infectées par *M. tuberculosis* et nous analyserons les charges bactériennes, les paramètres histologiques et immunologiques au cours de l'infection pour déterminer les facteurs liés au sexe. Pour explorer directement le rôle des stéroïdes, nous répèterons les expériences précédentes sur des souris castrées (afin d'éliminer la production

d'hormone stéroïdiennes) comparées à des souris contrôles non castrées. Afin de déterminer précisément le rôle des hormones sexuelles sur les différentes populations immunitaires, nous utiliserons des souris transgéniques chez lesquelles l'expression des récepteurs stéroïdiens sera éliminée sur des types cellulaires choisis: les macrophages/cellules dendritiques, les cellules T et les cellules lymphoïdes innées. Nous déterminerons ainsi par ces différentes approches le rôle des hormones stéroïdiennes dans le contrôle de la réponse immunitaire au cours de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 6000.

Afin de s'inscrire dans le respect de la règle des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, les expériences réalisées font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle murin. Ensuite, certaines étapes des de nos projets pourront être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats. De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur le même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés. Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Afin de prendre en charge le stress et la douleur générées lors de la procédure expérimentale, nous avons mis en place les éléments suivants: l'infection par *M. tuberculosis* est réalisée sous anesthésie ; la pathologie pulmonaire induite est limitée dans son intensité par l'arrêt de l'expérience à des temps très courts par rapport à ceux induisant une souffrance chez l'animal et par ailleurs un suivi quotidien est réalisé. La détection de signes éventuels de souffrance selon des points limites précis (perte de poids >15%, posture, mouvements, aspect du poil) conduira à un arrêt immédiat de l'expérience pour l'animal considéré selon des procédures déjà appliquées et validées sur le plan éthique dans nos projets antérieurs. Tous les animaux sont hébergés selon les normes en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation. Au total, notre projet fournira des connaissances sur la façon dont les hormones stéroïdes ont un impact sur l'immunité les dommages tissulaires dans la TB et pourraient trouver un développement au-delà de la TB.

12876 Les immunoglobulines A sécrétaires (sIgA) sont des acteurs importants de la réponse immunitaire au niveau des muqueuses. Les sIgA possèdent la caractéristique très intéressante de pouvoir traverser dans les deux sens la muqueuse intestinale.

Nous souhaitons utiliser ces propriétés importantes des sIgA dans une approche vaccinale visant à cibler spécifiquement les muqueuses de l'intestin après administration orale. Notre hypothèse de travail est que une fois dans la muqueuse, les IgA couplées à un antigène vaccinal pourraient interagir avec les cellules immunitaires présentes dans les tissus lymphoïdes associés à l'épithélium pour induire une réponse immunitaire mucosale. Si cette hypothèse s'avère confirmée, les sIgA pourraient être utilisées comme vecteur de convoyage d'antigènes vers les muqueuses, permettant l'induction de réponses immunitaires locales.

Ce protocole vise à étudier le transport de ces IgA à travers les muqueuses de l'intestin. Dans ce but, nous souhaitons ligaturer l'intestin et y administrer une solution contenant des IgA. Ensuite, nous quantifierons la quantité d'IgA transportée dans la muqueuse.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : De l'analyse *in vitro* sera effectuée au cours du projet, notamment pour le transport des IgA à travers une lignée de cellules intestinales humaine. Mais ces analyses *in vitro*, bien qu'indispensables, ne sont pas suffisantes pour analyser le transport d'IgA médié par toutes les cellules présentes dans la muqueuse intestinale. L'utilisation de souris permet de se rapprocher de la situation clinique au cours de laquelle les IgA sont confrontées au mucus et protéases.

Réduire : Le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 100 souris sur une période de 5 ans.

Raffiner : Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale. Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgesie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux, dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

12877 L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie sévère touchant en Europe environ 6. 5 millions de patients. Les traitements actuels de l'IC sont insuffisants, contribuant à placer l'IC comme première cause de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires, avec en France 32 000 morts prématurées chaque année. Ces données représentent une forte incitation pour le développement des nouvelles approches thérapeutiques pour l'IC, notamment post-infarctus du myocarde (IDM) comme la première cause de l'IC. En parallèle du système vasculaire sanguin coronaire, le cœur est irrigué par un autre système vasculaire moins connu: les lymphatiques. Le dysfonctionnement du réseau lymphatique provoque l'œdème ainsi que l'inflammation.

Nos travaux récents pointent vers un nouveau type de traitement de l'IC ciblant les lymphatiques, appelé la lymphangiogenèse thérapeutique, envisagé auparavant uniquement comme un recours potentiel chez de patients atteints d'œdème périphérique. Par contre, l'impact de la lymphangiogenèse sur l'œdème et l'inflammation au niveau cardiaque post-IDM et pendant le développement de l'IC, et ses conséquences sur la fonction cardiaque, ont très peu été abordés.

Dans ce projet, nous allons évaluer dans des modèles expérimentaux le rôle du drainage lymphatique au niveau du cœur post-IDM chez la souris femelle. Nous allons étudier pour la première fois, si la lymphangiogenèse thérapeutique cardiaque par thérapie génique pourrait limiter le développement de l'IC associée à ces perturbations. Le but ultime de cette recherche est d'aborder l'hypothèse selon laquelle la lymphangiogenèse pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires. Nous espérons que cette recherche permettra la mise en place d'une nouvelle classe de traitements permettant de limiter le développement de l'IC chez des patients suite à l'IDM. Cette recherche nécessite des expérimentations sur 266 souris.

Dans l'objectif de répondre à la règle des 3R dans ce programme de recherche nous œuvrons pour : Remplacer certaines expériences par des études *in vitro* (prolifération de cellules, interactions cell-cell).

Réduire le nombre d'animaux par l'utilisation des méthodes non invasives (IRM, échocardiographie) permettant de répéter les analyses sur le même animal au cours de la maladie, mais aussi grâce à l'utilisation de tests statistiques appropriés. Notre expérience montre que des groupes de n=15 sont nécessaires dans le modèle IDM pour des évaluations fonctionnelles à 6 semaines post-IDM. Une meilleure survie postopératoire permet de limiter le nombre d'animaux par groupe dans le modèle d'IDM.

Raffiner : Les animaux sont hébergés aux normes requises et leur milieu sera enrichi. Des points limites adaptés, une stratégie d'anesthésie et d'analgesie seront mise en place avec un suivi quotidien du bien-être animal.

Cette étude devrait permettre : (1) de mieux comprendre le rôle de la lymphangiogenèse cardiaque dans la physiopathologie de maladies cardiovasculaires (post-IDM chez la souris femelle) ; (2) de préciser les mécanismes responsables du remodelage délétère cardiaque (fibrose, inflammation, œdème et hypertrophie) pendant le développement de l'IC ; et (3) l'évaluation préclinique des nouvelles approches thérapeutiques.

12878 La neurofibromatose de type 1 touche un individu sur 3500 et se manifeste par l'apparition de tumeurs du système nerveux périphérique (neurofibromes qui peuvent parfois dégénérer en

cancers agressifs) ou du système nerveux central (gliome). Dans 40 à 50% des cas, les patients atteints de neurofibromatose de type 1 présentent des déficits intellectuels, c'est à dire des difficultés d'apprentissage, de perception et de résolution de problèmes. Le gène responsable de la maladie est nommé Nf1, il produit la neurofibromine dont la diminution de l'expression chez les malades est responsable de la maladie. Cette protéine est exprimée dans de nombreux tissus dont le cerveau. Elle joue un rôle dans le développement de l'organisme et reste exprimée à l'âge adulte. 50% des modifications du gène sont transmises de manière héréditaire et peuvent être diagnostiquées en période prénatale. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour soigner ces déficits cognitifs une fois que ceux-ci apparaissent ou pour empêcher leur développement.

Nous travaillerons sur un modèle murin de la neurofibromatose, les souris Nf1+/- dont une des deux copies du gène Nf1 a été invalidée. La lignée sera maintenue par croisement des animaux. Des résultats de notre équipe ont révélé une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter les déficits cognitifs de la schizophrénie. Cette stratégie repose sur le blocage d'un récepteur de la sérotonine, le récepteur 5-HT6. Sur cette base, les objectifs de ce projet sont de déterminer :

1) si cette stratégie thérapeutique est efficace pour traiter les déficits cognitifs de patients adultes atteints de neurofibromatose de type 1 en utilisant un modèle préclinique de la maladie et de caractériser les altérations de la transmission nerveuse et les mécanismes moléculaires impliqués dans les déficits cognitifs présents dans la neurofibromatose de type 1.

2) de réaliser un traitement précoce (prénatal et/ou postnatal) des souris Nf1+/- afin de prévenir les altérations développementales.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1004 souris au total.

Respect de la règle des 3R

Remplacer: Une recherche bibliographique approfondie (période 2007-2018) a été réalisée afin de nous assurer qu'il n'existait aucune approche alternative qui aurait pu être utilisée pour étudier l'effet d'un antagoniste du récepteur 5-HT6 et d'un inhibiteur du complexe mTOR sur le comportement d'une souris. En effet, les méthodes *in vitro* essentiellement basées sur les cultures cellulaires, ne permettent pas de maintenir l'intégrité des réseaux cellulaires et de reproduire la connectivité entre plusieurs structures cérébrales nécessaires à l'expression d'un comportement et à l'étude du développement cérébral et donc à la réalisation de ce projet.

Réduire: Le nombre d'animaux utilisés dans chaque lot est réduit grâce à une approche rationnelle, déterminé par une étude statistique. Nous utiliserons aussi bien des mâles que des femelles pour nos expériences. Enfin, plusieurs informations seront obtenues avec le même animal en réalisant à la fois des expériences comportementales et moléculaires sur les mêmes animaux.

Raffiner: Nous vérifierons que les animaux soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Afin de maintenir le bien-être des animaux, nous allons optimiser l'hébergement, le soin et l'élevage des animaux. En effet, les animaux seront maintenus en groupe sociaux puisqu'ils ne seront jamais isolés pour les expériences. Les cages seront enrichies avec une petite maison en carton. La mutation n'induit pas de phénotypes délétères à l'âge auquel nous les utilisons. Les soins apportés seront ceux répondant aux bonnes pratiques de zootechnie. Une habituation par manipulation des animaux sera faite avant les expérimentations pour limiter le stress. Enfin, une observation régulière et l'application de points limites seront au cœur de notre démarche de raffinement dans le suivi des animaux. Une anesthésie sera réalisée au début des procédures les plus douloureuses.

12879 Les vascularites (inflammations des parois des vaisseaux sanguins) associées aux ANCA (anticorps anti neutrophiles) sont des maladies inflammatoires auto-immunes, caractérisées par une insuffisance rénale souvent irréversible. Cela conduit ainsi à la nécrose de la paroi vasculaire des vaisseaux sanguins de petites et moyennes tailles. Ce phénomène s'accompagne également d'une infiltration par des cellules immunitaires (neutrophiles et monocytes). De ce fait, on assiste à un remodelage tissulaire et un dépôt progressif des molécules de la matrice extracellulaire (ECM), notamment la ténascine-C (TNC). La morphologie tissulaire et les fonctions biologiques du rein sont

donc altérées, du fait d'une obstruction irréversible des vaisseaux sanguins et du processus de cicatrisation, conduisant à une maladie rénale chronique (CKD).

La TNC est une molécule de la matrice extracellulaire qui est surexprimée dans plusieurs pathologies comme le cancer, la fibrose et l'inflammation chronique. Elle est aussi impliquée dans plusieurs fonctions biologiques telles que l'adhésion cellulaire, la liaison à des facteurs solubles et la formation de complexe avec d'autres molécules de la matrice extracellulaire. Toutefois, les mécanismes moléculaires dans lesquels la TNC est impliquée pour assurer ces fonctions biologiques, restent à l'heure actuelle très peu étudiés.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier le rôle de la TNC dans le développement et la progression des inflammations chroniques, qui induisent l'insuffisance rénale. Pour cela, nous utiliserons des modèles murins surexprimant la TNC mais également des modèles invalidés pour cette molécule. Le projet sera divisé en 3 étapes : une étude préliminaire de mise au point, une étude générale du dommage vasculaire et des thérapies potentielles, et l'étude *in vitro* des mécanismes moléculaires de la nérose (processus provoquant les dommages vasculaires). A terme, ce projet identifiera si la TNC est une cible thérapeutique intéressante pour prévenir les maladies chroniques rénales, et ainsi améliorer la qualité de vie des patients atteints par cette pathologie.

Respect de la règle des 3R :

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

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. Nous avons de plus mis en place une étude préliminaire afin de mettre au point les conditions d'induction de l'inflammation, ceci afin de réduire le nombre d'animaux utilisé dans l'étude générale qui suivra. Un total de 944 souris sera nécessaire pour mener à bien les 3 étapes de cette étude.

Raffiner: Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. L'état de santé des animaux est vérifié tous les jours et des points limites ont notamment été établis pour éviter toute souffrance. Les souris sont maintenues en groupe de 3 minimum par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à la nourriture et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une administration par voie intrapéritonéale d'un analgésique sera effectuée une fois par jour jusqu'à disparition des symptômes. Un tableau de détermination des points limites sera également mis en place : ceci consistera à vérifier 3 fois par semaine un certain nombre de paramètres pour évaluer le bien-être de l'animal (pesée, évaluation de l'apparence et de la réactivité de l'animal, de l'interaction avec son environnement, etc.). Des critères d'arrêt seront fixés conduisant, si nécessaire à la mise à mort de l'animal.

12880 Notre projet a pour objectif de déterminer le rôle d'une population de neurones qui libèrent de l'acétylcholine (interneurones cholinergiques, IChs) dans une structure profonde du cerveau appelée striatum. Un dérèglement du fonctionnement de ces interneurones est mis en cause dans les troubles compulsifs observés dans des maladies neuropsychiatriques comme le syndrome de Gilles de la Tourette (SGT). Dans le striatum, l'acétylcholine interagit avec d'autres neurotransmetteurs (dopamine, GABA) pour contrôler l'excitabilité des circuits neuronaux qui participent à l'expression de commandes motrices adaptées. Cependant, on ignore quel est précisément l'impact de la composante cholinergique striatale sur l'intégrité du comportement moteur. Notre projet a pour but d'établir un lien causal entre l'activité des IChs striataux et la survenue de troubles compulsifs. Il s'agit d'un projet de recherche fondamentale qui consiste à perturber, chez l'animal, le fonctionnement des IChs afin d'examiner les conséquences sur le comportement. Nous vérifierons si cette perturbation est associée à des tics ou stéréotypies qui miment les anomalies motrices observées dans le SGT. Nous disposerons ainsi d'un modèle de dysfonctionnement cholinergique chez l'animal susceptible de reproduire les compulsions

observées en pathologie chez l'homme. Ce projet a donc également une dimension appliquée en offrant la possibilité de tester des thérapies pour compenser la déficience cholinergique et les déficits du comportement associés. Un tel enjeu est important car les traitements pharmacologiques actuels des troubles compulsifs ciblent préférentiellement les neurotransmissions dopaminergique (neuroleptiques) et sérotoninergique (inhibiteurs de la recapture de sérotonine), mais pas cholinergique, ce qui permet d'envisager de possibles innovations thérapeutiques.

Dans ce projet, planifié sur 3 ans, nous cherchons à induire des troubles compulsifs impossibles à reproduire sur des systèmes cellulaires simplifiés, ce qui rend l'expérimentation chez l'animal entier indispensable à la compréhension des mécanismes à l'origine de ces anomalies comportementales. Nous avons choisi le singe macaque car c'est l'espèce de primate sur lequel l'organisation des circuits neuronaux et leurs caractéristiques biochimiques et physiologiques sont les mieux connues et les plus proches de l'homme. De plus, le comportement moteur des primates présente des spécificités (dextérité manuelle entre autres). Pour cette raison, les mouvements anormaux susceptibles d'être induits par manipulation expérimentale chez cette espèce ont plus de chance d'être comparables à ceux observés en clinique humaine.

Pour réaliser l'inactivation des IChs, nous emploierons une approche de pharmacogénétique utilisant les DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). Il s'agit de récepteurs modifiés qui se lient, de façon sélective et réversible, à un ligand de synthèse, cette liaison ayant pour effet d'inhiber sélectivement l'activité des neurones porteurs du récepteur en question. Pour faire exprimer le gène codant pour le DREADD dans une population de neurones particuliers, nous aurons recours à une stratégie de transduction virale qui consiste à transférer des gènes étrangers dans les cellules d'un organisme à l'aide de vecteurs viraux qui infectent ces cellules. Pour limiter l'expression du DREADD aux seuls IChs, nous utiliserons un promoteur de la choline acétyltransférase (ChAT), l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine. Comme cette procédure d'inactivation n'a jamais été utilisée chez le singe pour étudier les IChs du striatum, il importe avant tout de démontrer la faisabilité de cette approche. Pour cela, des virus porteurs d'un gène d'intérêt sous contrôle du promoteur de la ChAT seront injectés dans le striatum de 4 singes macaque. Les animaux seront euthanasiés après 10 jours pour procéder à une analyse immunohistochimique destinée à évaluer si la transduction est effective et si l'expression du gène d'intérêt est limitée aux seuls IChs.

Ce projet de recherche a été élaboré en respectant la règle des 3R :

Remplacer: Aucune alternative aux tests chez l'animal entier n'est envisageable pour notre projet dans la mesure où il est impossible de remplacer la complexité des interactions neuronales au sein du striatum chez l'animal vivant par un modèle cellulaire *in vitro* ou une simulation informatique sur réseaux de neurones. Il n'est pas non plus possible de valider l'efficacité de la transduction virale sur une espèce autre que celle qui nous sert de modèle d'étude (singe macaque). En effet, l'efficacité de la transduction virale peut varier non seulement selon le type de vecteur et la région cérébrale, mais aussi selon l'espèce animale, ce qui constitue un obstacle à une validation préalable chez le rongeur pour une application chez le primate.

Réduire: Pour limiter autant que faire se peut le nombre d'animaux requis pour notre projet, nous prévoyons d'en inclure 4. Nous réaliserons plusieurs injections de vecteurs viraux dans chaque hémisphère cérébral et dans différentes parties du striatum afin d'optimiser l'utilisation des animaux et d'économiser le nombre requis pour mener à terme le projet. **Raffiner:** Les singes seront hébergés dans notre animalerie qui offre toutes les garanties de suivi sanitaire et de soins post opératoires. Ils seront maintenus par groupes de 2 ou 3, selon les affinités, et divers enrichissements seront disponibles pour leur bien-être (accès volière, objets à manipuler, perchoirs, cordages). Les procédures chirurgicales employées dans ce projet, établies en concertation avec le vétérinaire, ont plusieurs fois démontré leur fiabilité pour garantir une récupération post opératoire rapide. Une surveillance quotidienne sera assurée pendant les 10 jours qui suivent les injections avec, si nécessaire, des soins spécifiques au niveau de la cicatrice crânienne. L'avis du vétérinaire sera sollicité dès qu'une anomalie de l'état général des animaux est suspectée.

12881 Les maladies neuromusculaires englobent un large éventail de pathologies, certaines se caractérisant par la perte progressive des motoneurones pour aboutir finalement à la mort des patients. La sclérose amyotrophique latérale ou certaines formes de dystrophies musculaires sont des exemples de cette classe de maladies. Il n'existe actuellement aucun remède pour ces maladies sans doute parce qu'au-delà du défi de maintenir ou de renouveler la population des motoneurones de la moelle épinière, une thérapie efficace doit également veiller à ce que les muscles situés en périphérie soient correctement innervés mais aussi que les interactions sensori-motrices et neurogliales soient préservées. Ainsi, toute stratégie thérapeutique ou régénérative, y compris l'utilisation de cellules souches, exige une connaissance intime des mécanismes qui régulent d'une part la production et / ou le maintien des motoneurones, l'orientation de leurs axones vers leurs muscles cibles mais aussi les interactions entre différents compartiments cellulaires.

L'objectif de notre projet est de caractériser les mécanismes qui contrôlent l'innervation des membres par les neurones moteurs au cours du développement embryonnaire. Ce projet fait appel à des lignées existantes de souris génétiquement modifiées pour les gènes *Efnb1* et *Efnb2* mais aussi à des lignées exprimant la Cre recombinase et des protéines rapportrices fluorescentes. Il repose sur l'entretien (hébergement et élevage) de ces lignées déjà existantes, la réalisation de croisements en vue d'obtenir des embryons à différents stades de développement et des prélèvements d'embryons.

Respect de la règle des 3 R

Remplacer : La caractérisation des mécanismes qui contrôlent l'assemblage du circuit sensori-moteur composé de différents types cellulaires au cours du développement ne peut être faite pour l'heure dans un modèle « *in vitro* » ou « *in silico* », nécessitant l'utilisation d'animaux vivants.

Réduire Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous concentrerons nos analyses sur 3 stades clés du développement embryonnaire. Les analyses immunohistochimiques seront réalisées sur 4 individus pour chaque génotype à chaque stade, ce qui est le minimum pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Les échantillons seront inclus en paraffine ce qui nous permet de collecter un grand nombre de coupes pour chaque échantillon et ainsi réaliser toute la série de marquages immunohistochimiques nécessaires à la caractérisation des phénotypes. Le projet nécessite l'utilisation de 184 animaux expérimentaux.

Raffiner : Les expériences de marquage rétrograde sont réalisées sur des explants prélevés après mise à mort. Ces procédures n'entraînent pas de douleurs ou de souffrance.

12882 L'élaboration de nouvelles/meilleures stratégies thérapeutiques pour lutter contre le cancer sont aujourd'hui nécessaires. En effet, certaines chimiothérapies induisent des effets secondaires très graves et plus inquiétant encore, certains traitements impliquent un très mauvais pronostic. Des traitements thérapeutiques alternatifs sont donc requis. Dans ce projet, nous souhaitons étudier le potentiel clinique de nouveaux composés pour la thérapie photodynamique (PDT), en se concentrant non seulement sur une efficacité biologique améliorée dans des conditions cliniquement pertinentes, mais aussi sur la réduction des effets secondaires par rapport aux traitements traditionnels.

Le concept général de la PDT est basé sur l'utilisation d'un composé appelé photosensibilisateur (PS). Le PS réagit avec la lumière pour produire des espèces toxiques qui entraînent la mort des cellules cancéreuses. Les avantages de la PDT sur d'autres thérapies sont le fait que les cellules meurent uniquement dans les zones irradiées par le médecin. Le traitement d'organes internes peut ainsi être atteint par l'utilisation d'endoscopes et de cathéters en fibre optique pour acheminer la lumière.

A 9 semaines, les animaux seront implantés en sous cutané avec un fragment de cellules cancéreuses. Un suivi de la croissance des tumeurs sera réalisé par imagerie et 1 semaine après l'implantation de tumeur, une injection des composées de ruthénium et le traitement au laser seront réalisés. L'efficacité de la thérapie sera évaluée par le suivi de la croissance tumorale par imagerie, la survie et la courbe de poids des animaux. L'utilisation de l'imagerie dans cette étude nous permet

de suivre le même animal au cours du temps et donc de réduire le nombre d'animaux nécessaire. Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Une caractéristique importante de ce projet est qu'il est envisagé d'utiliser une nouvelle classe de PS qui contrairement à ceux disponibles sur le marché possèdent de nombreux avantages (synthèse et purification aisées, meilleure solubilité dans l'eau, élimination rapide du PS). Il a été récemment démontré que ces PS avaient une activité importante sur plusieurs lignées cellulaires ainsi que sur des mini-tumeurs (sphéroïdes 3D), ce qui est très prometteur. Avec de tels résultats, il est maintenant important de démontrer que ces composés ne fonctionnent pas uniquement *in vitro* mais aussi chez l'animal. Dans ce contexte, la souris est le meilleur modèle animal permettant d'atteindre nos objectifs.

Réduire : Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera 1322 souris. Nous utiliserons un modèle de tumeur colorectale et un modèle de tumeurs mammaires. Des études préalables ont permis de sélectionner les composés les plus efficaces, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. En effet, sur les 40 composés originaux seulement 5 seront évalués sur l'animal après une sélection effectuée *in vitro*.

Raffiner Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Exceptée l'administration des traitements, toutes les autres procédures seront réalisées sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence, son comportement, révélateurs du niveau de douleur. En cas d'atteinte de points limites, la mise à mort de l'animal sera anticipée.

12883 Notre formation universitaire offre aux étudiants la possibilité d'acquérir une formation de pointe dans le domaine de la neurobiologie. Au vu de notre expertise, nous proposons une unité d'enseignement dans laquelle les étudiants réaliseront des travaux pratiques leur permettant de générer et de caractériser un modèle murin d'une pathologie neuronale : la maladie de Huntington.

Au travers de ces travaux pratiques, les étudiants acquièrent des compétences techniques et théoriques de base en neuropharmacologie. Ils observeront la technique de chirurgie stéréotaxique chez la souris anesthésiée qui sera réalisée par un encadrant bénéficiant de la formation chirurgie. Deux semaines après la chirurgie, les étudiants réaliseront quatre tests comportementaux sur les animaux traités (lésion unilatérale du striatum par injection stéréotaxique de quinolinate) et sur les animaux contrôle (pas de chirurgie) : évaluation de l'activité locomotrice (cage d'activité), score d'atteinte striatale (claspings), évaluation de l'asymétrie motrice (test du cylindre) et évaluation de l'intégration sensori-motrice (test de l'adhésif). Les animaux seront euthanasiés à la fin de la séance de travaux pratiques et les cerveaux seront récupérés pour vérifier en neuroanatomie la présence d'une lésion striatale suite à l'injection stéréotaxique.

Lors de ces travaux pratiques, nous sensibilisons les étudiants aux questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale. Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3 R :

Remplacer : Ce type de travail visant à comprendre l'effet d'une perte neuronale dans une région cérébrale sur le comportement moteur ne peut être mené que sur un animal vivant (remplacer).

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe de 16 étudiants utilisera 2 souris contrôle et 2 souris lésées. Les observations obtenues par l'ensemble des groupes seront mises en commun pour la réalisation d'une analyse statistique des résultats. Compte tenu du nombre d'étudiants attendu dans la formation (80 étudiants par an, soit 5 groupes de 16 étudiants), pour réaliser ces travaux pratiques, nous utiliserons 20 souris par an soit 100 souris pour la totalité du projet (5 ans). Nous avons cherché à réduire le nombre d'animaux à son minimum, ce qui justifie que nous n'ayons pas utilisé d'approche statistique pour calculer de nombre d'animaux. En effet, le but du TP est de former nos étudiants à ce type d'expériences

Raffiner : En ce qui concerne le raffinement, un enrichissement des conditions d'hébergement sera effectué et les animaux seront surveillés quotidiennement afin de repérer d'éventuels signes de

douleurs et d'y remédier. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12884 -Raison du projet : La coccidiose est la principale parasitose qui affecte l'aviculture industrielle. Elle est responsable de morbidité et mortalité et engendre des pertes économiques importantes pour les éleveurs. La coccidiose est causée par des parasites unicellulaires, communément appelées coccidies, colonisant le tractus intestinal. Le cycle de vie des coccidies est direct et très court (moins d'une semaine) et débouche sur la formation d'oocystes excrétés dans les fèces. Les oocystes sont très résistants aux conditions climatiques et peuvent survivre pendant une longue période dans l'environnement. Les coccidies aviaires appartiennent toutes au genre *Eimeria*.

- Objectif du projet : Dans un premier temps, le projet vise à développer et caractériser des modèles expérimentaux de coccidioses chez l'espèce cible. Dans un deuxième temps, ces modèles serviront à tester l'efficacité et l'innocuité de produits vétérinaires (vaccins, médicaments ou additifs) chez l'espèce cible. Ce projet couvrira également la réactivation des inocula coccidiens chez l'espèce cible.

- Bénéfice attendu du projet : L'établissement de modèles expérimentaux contrôlés et reproductibles est nécessaire au développement de nouvelles thérapies (préventives ou curatives) qui seront utilisées plus tard dans les élevages.

- Animaux : Ces modèles seront développés chez les oiseaux domestiques (poulets, poules pondeuses, dindes, canards, oie). L'âge et le sexe des animaux du projet dépend du modèle d'étude.

- Dommages attendus : La souffrance attendue est sévère et correspond à la pathologie induite par le l'inoculation de coccidies. Les signes attendus sont une entérite, parfois hémorragique, pouvant entraîner des retards de croissance, de la diarrhée, une prostration, et la mort de l'animal. Les signes cliniques sont attendus 3 à 5 jours après inoculation du parasite.

- Application de la règle des 3R :

Remplacer: Aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet.

Réduire : Le nombre d'animaux sera réduit au minimum en fonction des objectifs de l'étude. Pour les études de développement de modèles le nombre d'animaux sera réduit au minimum de façon à caractériser le modèle (% de mortalité, signes cliniques, cinétique des oocystes dans les fèces, perte de poids). Pour les études d'efficacité, le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat. Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux par groupe sera basé sur les lignes directrices (VICH). Le nombre d'animaux utilisés pour réactiver les inocula sera également réduit au strict minimum.

Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. Généralement, s'agissant d'études comparatives, 2 à 5 groupes seront constitués, le nombre d'animaux par groupe sera entre 12 à 100. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 2, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 5000 animaux.

Raffiner : Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux. Pendant la phase animale (après inoculation), l'état de santé des animaux sera évalué 2 fois/jour par le personnel en charge des animaux. En cas de dépassement des points limites définis, les animaux seront euthanasiés selon une des méthodes autorisées dans la directive.

12885 L'objectif de ce projet est de vérifier l'efficacité d'immunisation de produits biologiques et/ou d'évaluer leur stabilité dans le temps. Ces démarches sont obligatoires lors du développement d'un nouveau produit et avant sa mise sur le marché. La souris est alors l'un des modèles privilégiés pour mettre en évidence les réactions d'immunisation.

Respect de la règle des 3 R :

Remplacer : Les méthodes alternatives existantes ne permettent pas de remplir cet objectif.
Réduire : Le nombre d'animaux à utiliser a été établi comme étant le nombre minimum pour conclure scientifiquement sur le potentiel immunisant. Au total, dans le cadre de ce projet, il est estimé à 150 souris par an.

Raffiner : Tout animal est anesthésié avant de procéder à des prélèvements. De plus, les animaux bénéficient d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long de l'essai. Enfin, les souris étant des animaux grégaires, elles sont hébergées en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (bâton à ronger) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

12886 Au cours de leur cursus universitaire, les étudiants en master 1 spécialité "Neurosciences" sont amenés à suivre un "apprentissage par projet" (APP). L'objectif est de leur permettre sur 10-15 jours d'apprendre, par la pratique, différentes méthodes autour d'une thématique translationnelle. Dans ce cadre, notre équipe participe à un APP sur le thème de la myéline qui aborde autant les aspects les plus cellulaires et moléculaires de la myélinisation du système nerveux central que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour l'évaluation des patients atteints de sclérose en plaques. Notre équipe étant spécialisée dans les modèles murins de sclérose en plaques (*in vitro* et *in vivo*), les étudiants pourront apprendre concrètement comment induire et analyser ces modèles de démyélinisation. Ainsi, nous leur montrerons comment développer et entretenir en culture des oligodendrocytes, les cellules du système nerveux central spécialisées dans la production de myéline. Ils apprendront également à réaliser des injections stéréotaxiques dans le cerveau des souris pour induire une lésion focale de démyélinisation dans le corps calleux. Enfin, ils apprendront à perfuser les souris pour fixer les tissus afin de réaliser des sections histologiques à analyser en microscopie.

Cette formation se fera dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R.

Remplacer : Le cerveau est un des organes le plus complexes, et le processus de réparation que nous étudions met en jeu de multiples populations cellulaires qui interagissent entre elle, ce que ne peut pas miner pour l'heure un modèle *in vitro*. L'utilisation des animaux est donc nécessaire pour la réalisation de ce projet.

Réduire : Nous utiliserons des souris générées pour un autre projet mais non utilisées en raison du génotype d'intérêt, ce qui évitera de générer des animaux spécifiquement pour cette formation. Nous réduirons le nombre de souris adultes à 1 par étudiant, et ce même animal servira pour l'apprentissage de la chirurgie et de la perfusion. Chaque année (c'est à dire à chaque nouvelle promotion d'étudiants en master1), 11 souris adultes seront destinées à l'apprentissage de la chirurgie et de la perfusion, et 10 nouveau-nés seront utilisés pour la culture cellulaire, soit au total 105 souris dont 55 adultes et 50 nouveau-nés sur 5 ans.

Raffiner : La douleur sera évitée au maximum par l'administration d'antalgiques en pré et post-opératoire, et les animaux seront par la suite en surveillance rapprochée. Les conditions d'hébergement des souris sont adaptées aux besoins physiologiques de l'animal (en groupes sociaux, cycle jour-nuit, nourriture et boisson ad libitum) avec un enrichissement environnemental (cages contenant des barres de bois à ronger, du coton pour la nidification).

12887 Ce projet a pour but d'étudier le rôle d'un nouvel acteur dans le développement de la fibrose cardiaque consécutive à l'infarctus du myocarde de manière à évaluer l'intérêt d'une thérapie ciblant spécifiquement. Suite à une maladie du muscle cardiaque, le cœur subit un remodelage dont la fibrose interstitielle myocardique est un des mécanismes clés. Cette fibrose est responsable d'une

rigidification du cœur qui altère la fonction cardiaque de manière irréversible et conduit à l'insuffisance cardiaque. Aujourd'hui, plus de 6.5 millions d'individus sont touchés par cette pathologie en Europe. Il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueur sensible et précoce de la fibrose cardiaque et il n'existe pas de moyens thérapeutiques permettant d'empêcher son développement. Ainsi, la fibrose interstitielle constitue une cible thérapeutique majeure pour la prévention et le traitement de l'insuffisance cardiaque. Ce travail a donc pour objectif de vérifier *in vivo* l'implication d'un nouvel acteur de la fibrose cardiaque et de tester l'effet d'une thérapie la ciblant spécifiquement.

En effet, nous avons montré *in vivo* que la molécule XX est exprimée au niveau cardiaque en réponse à un infarctus du myocarde. De plus, *in vitro*, cette molécule XX augmente de manière drastique la synthèse de tissu fibrotique par des cellules cardiaques. Ce travail visera à apporter la preuve que la molécule XX est effectivement un nouvel acteur de la fibrose cardiaque et que l'utilisation d'anticorps bloquant spécifiquement cette cible pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique dans la prise en charge de cette pathologie. Ce travail s'organise donc autour de trois objectifs 1) comparer la réponse fibrotique consécutive à un infarctus du myocarde chez des souris sauvages avec celle observée chez des animaux n'exprimant pas XX, 2) tester l'effet préventif de l'injection d'anticorps ciblant XX chez des souris avant qu'elles subissent un infarctus du myocarde, 3) tester l'effet curatif de l'injection de ces anticorps pendant 3 semaines après qu'elles aient subi un infarctus du myocarde.

Pour réaliser ces objectifs, nous aurons donc recours à l'induction d'un infarctus du myocarde qui sera l'atteinte cardiaque permettant d'induire le développement de la fibrose cardiaque. L'infarctus du myocarde est induit chirurgicalement par ligature de l'artère coronaire gauche. Cette procédure de classe sévère sera réalisée chez des animaux anesthésiés, analgésiés et placés sous assistance respiratoire pendant l'ensemble de la procédure chirurgicale. Une surveillance rapprochée des animaux sera assurée pendant la phase de réveil des animaux ainsi que pendant les heures suivant l'intervention. Ces animaux seront également placés en cages isolées de manière à réduire les risques de mutilations inter-individus. Une grille de score de la douleur permettra, à l'expérimentateur, au vétérinaire référent et aux personnels en charge du suivi journalier de ces animaux d'évaluer leur niveau de douleur et de mettre en place rapidement les mesures permettant de limiter la souffrance de ces animaux. La fonction cardiaque de tous les animaux sera mesurée par échocardiographie à J5, J21 et J28 post-infarctus. Cette procédure de classe légère, non invasive, sera réalisée sous anesthésie gazeuse. Elle nous permet d'évaluer l'étendue de l'atteinte cardiaque sans euthanasier l'animal ni lui occasionner de souffrance supplémentaire. Elle permet également d'avoir un suivi longitudinal des animaux et participe à la réduction des effectifs. Enfin, les objectifs 2 et 3 nécessitent l'injection intraveineuse d'anticorps pour permettre de tester leur effet thérapeutique sur le développement de la fibrose cardiaque induite par l'infarctus du myocarde. L'injection intraveineuse sera réalisée en alternant voie caudale et voie veineuse de manière à diminuer les risques d'altérations veineuses et permettre une meilleure tolérance de ces injections par les animaux.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Malgré l'utilisation de culture *in vitro* de cellules cardiaques isolées, ces dernières ne peuvent remplacer l'organisme entier en raison de l'isolement des cellules du contexte physiologique. Le modèle animal reste donc indispensable dans ce projet.

Réduire : La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ce projet utilisera un total de 1206 souris en fond C57bl6.

Raffiner : Toutes les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises. Ainsi l'ensemble de ces

arguments démontre la faisabilité de notre projet. Le protocole sera immédiatement arrêté si l'animal présente un mauvais état de santé.

12888 Toute personne souhaitant travailler dans notre structure doit suivre les formations réglementaires liées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques mais également suivre en interne une formation pratique et théorique assurée par les responsables de la structure. Elle permet aux utilisateurs de maîtriser les gestes techniques dans nos locaux et d'apprendre les bonnes pratiques et ainsi réduire le stress et/ou la douleur des animaux utilisés dans les projets de recherche.

Les procédures envisagées sont la préhension/contention, les injections intrapéritonéales, sous cutanée, intraveineuse, intradermique, intranasale, les gavages et le prélèvement de sang sous mandibulaire ou sinus rétro orbital. Certaines de ces procédures se feront sous anesthésie. L'espèce utilisée dans les projets de recherche est la souris. Nous utiliserons un maximum de 600 souris pour une période de 5 ans pour former tous les utilisateurs.

Concernant la règle des 3R :

Remplacer : Pour maîtriser certains gestes techniques qui seront utilisés, il est indispensable d'utiliser l'animal vivant.

Réduire : Nous utilisons des souris non-utilisées dans les projets de recherche et limitons le nombre d'animaux à 15 souris maximum par apprenant afin de former les utilisateurs aux bonnes pratiques dès le début et tout au long de leurs procédures.

Raffiner: Nous suivons particulièrement le bien-être des animaux au quotidien (utilisation d'analgésique et d'anesthésique pour les injections) et limitation du stress (enrichissement...)

12889 Les maladies d'Alzheimer et apparentées (MAA) sont des maladies neurodégénératives associées au vieillissement. Leur prévention constitue un enjeu essentiel en raison de l'importance du problème de santé publique qu'elles constituent et de l'absence de traitements efficaces à l'heure actuelle. Le vieillissement s'accompagne de dysfonctionnements métaboliques tels que la survenue de dérivés résultant de l'utilisation de l'oxygène et une sub-inflammation chronique. Des déséquilibres alimentaires favoriseraient ces phénomènes associés au vieillissement en modifiant les populations de bactéries intestinales et les flux de composés alimentaires passant de l'intestin au reste de l'organisme. Ces dysfonctionnements métaboliques fragiliseraient le cerveau, organe particulièrement sensible en raison de l'activité de son métabolisme et de la faiblesse des mécanismes protecteurs. Cette fragilisation cérébrale augmenterait le risque de survenue des MAA. Les organismes probiotiques, comme les bactéries lactiques présentes déjà dans l'alimentation de l'homme du néolithique, pourraient compenser les effets négatifs des déséquilibres alimentaires sur les bactéries intestinales et les troubles induits et transmis au cerveau.

La présente étude a pour but d'évaluer, chez la souris, les capacités de trois souches de bactéries probiotiques appartenant à des espèces utilisées dans l'industrie laitière à combattre les dysfonctionnements associés aux MAA. Ces derniers seront reproduits chez la souris par deux types d'apports : 1- un régime modérément hyperlipidique et riche en acides gras de la série ω -6, 2- un apport en galactose. Les acides gras poly-insaturés de la série ω -6, beaucoup retrouvés dans l'huile de consommation courante comme le tournesol et dans les graisses animales sont consommés en France en excès de 7 à 10 fois par rapport à leurs homologues ω -3, présentes dans certaines huiles réservées à la consommation crue dans les salades. Ce rapport ω -6/ ω -3 est supérieur aux recommandations des agences de nutrition européennes qui préconisent un rapport ω -6/ ω -3 inférieur à 5. Certains travaux scientifiques avancent que cet excès d' ω -6 pourrait induire une inflammation chronique. En particulier, l'acide arachidonique (ARA), le plus long acide gras ω -6, apporté par la consommation de produits d'origine animale, est converti en composés impliqués dans l'inflammation. Des études ont indiqué qu'un régime riche en ARA sensibilise les souris aux agents de la maladie d'Alzheimer. D'autres travaux ont montré que l'ARA favorise les espèces bactériennes pro-inflammatoires dans l'intestin et ainsi l'obésité et l'inflammation chez des souris mâles nourries par un régime hyperlipidique. Le lactose, le sucre du lait est constitué de galactose et de glucose. De nombreux travaux scientifiques ont montré qu'une administration de galactose en

sous cutanée, intrapéritonéale ou par l'eau de boisson pendant 6 à 8 semaines, provoque un vieillissement accéléré des souris ou des rats et une accumulation intracérébrale d'agents de la maladie d'Alzheimer. Des apports excessifs de ce sucre simple, très proche chimiquement du glucose, dépasseraient les capacités des voies métaboliques, provoquerait une déplétion de certaines molécules importantes pour l'équilibre entre oxydation et réduction induisant ainsi un excès de molécules dérivés de l'utilisation de l'oxygène.

L'étude, d'une durée de 9 semaines aura pour but d'évaluer les capacités de probiotiques à réduire/limiter ou combattre les dysfonctionnements associés aux MAA. Pour se faire, 8 lots de 25 animaux seront constitués soit 200 souris mâles Balb/C au total sur 5 ans. Trois conditions seront testées dans chacun de ces lots : régime alimentaire standard ou riche en ARA (P1), apport ou non de galactose, apport ou non de probiotiques (P2). Chacun des deux régimes alimentaires sera testé seul ou en association avec l'apport de galactose et/ou de probiotiques. Les animaux seront exposés au galactose et aux probiotiques tout au long de l'étude. Les fèces seront prélevées à intervalle régulier et les capacités de mémoire des animaux seront évaluées à l'aide de 3 tests comportementaux (P3-5). A la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort et des prélèvements de cerveau, de tissus intestinaux, de tissus adipeux et hépatiques seront effectués pour rechercher une inflammation, une surcharge lipidique, une atteinte des synapses et de les barrières intestinale (P6) et hémato-encéphalique (P7-8).

Respect de la règle des 3R:

Remplacer : Ce travail nécessite le recours à l'animal entier, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les effets négatifs des régimes alimentaires sur le microbiote intestinal et le retentissement sur les fonctions cérébrales ainsi que les effets positifs des probiotiques, il ne peut être substitué par des méthodes alternatives.

Réduire : Le nombre d'animaux est fixé à minima en tenant compte des différents types d'analyses, de l'exploitation statistique des données comportementales, de la validité et de l'interprétation scientifique des résultats.

Raffiner : Les souris seront nourries ad libitum et maintenues dans des cages contenant de l'enrichissement environnemental. En cas de comportement anormal (arrêt de la prise alimentaire ou hydrique perte de poids excessive, vocalise, piloérection, prostration, baisse de motricité ou de réactivité, respiration excessive, absence de toilettage), les animaux seront exclus de l'étude et mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. Les expérimentations seront effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur en termes de bien-être et de limitation de l'inconfort et de la douleur de manière à garantir la qualité des résultats.

En terme de conséquence pour l'homme, ce projet permettra de déterminer si des souches probiotiques sont capables chez la souris de diminuer les perturbations de grandes fonctions de l'organisme associées aux MAA et induites par les apports alimentaires. Une réponse positive permettra d'appuyer le concept que les bactéries intestinales jouent un rôle important dans la survenue de ces maladies liées au vieillissement chez l'humain et que des corrections sont possibles pour retarder la survenue de ces pathologies.

Ce projet a été validé par le conseil scientifique du laboratoire.

12890 Aujourd'hui, le personnel soignant possède un arsenal grandissant dans le traitement contre le cancer, faisant intervenir des techniques telles que la chirurgie, la chimiothérapie ou encore la radiothérapie. Outre la radiothérapie externe mettant en jeu une source de rayonnement externe au patient, les avancées diagnostiques et thérapeutiques en médecine nucléaire telles que l'Octreoscan et ses dérivés, utilisant le métabolisme des tumeurs, ont permis le développement de la radiothérapie interne vectorisée (RIV). Ainsi de nouveaux traitements de RIV sont à l'étude, utilisant les marqueurs cellulaires et le métabolisme de la cellule tumorale pour potentialiser le traitement et entraîner sa destruction tout en limitant l'impact sur le tissu sain avoisinant.

Cette étude concerne le traitement des cancers neuroendocriniens (NET) en utilisant des ligands radiomarqués qui se lient sur certains récepteurs membranaires. En effet, ces cancers surexpriment à la surface des cellules tumorales qui les constituent des récepteurs membranaires peptidiques

tels que les récepteurs à la somatostatine, à la cholécystokinine/gastrine (RCCK), etc. Après liaison des ligands radiomarqués à ces récepteurs membranaires, les ligands radiomarqués sont internalisés dans la cellule tumorale et le rayonnement émis par les ligands radiomarqués va permettre la destruction du noyau de la cellule tumorale et son élimination. Les récepteurs cibles choisis dans ce protocole sont exprimés dans le tissu tumoral mais pas ou peu dans le tissu sain permettant ainsi de ne cibler que la tumeur.

Dans ce projet, nous allons tester un nouveau radioligand optimisé d'un de ces récepteurs afin de transporter l'élément radioactif dans la tumeur.

Ce travail va permettre d'estimer l'efficacité d'un tel traitement sur des modèles *in vivo* de cancer médullaire de la thyroïde (CMT) et pulmonaire à petites cellules (CPPC) pour lesquels il n'existe pas actuellement de traitement réellement efficace, seul ou en association avec un autre traitement anti-tumoral développé dans notre laboratoire et qui présente une activité anti-tumorale sur ces types de cancers. Une telle association permettra de limiter les doses de radioactivité injectée.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : L'étude de l'efficacité et de la toxicité de nouveaux ligands nécessite un système intégré, l'utilisation de l'animal est pour l'heure indispensable.

Réduire : Ces études seront réalisées chez des souris immunodéficientes et nécessiteront un nombre total de 795 souris. Le nombre de souris utilisées sera le nombre minimal d'animaux qui permettra d'avoir des résultats significativement exploitables. D'autre part, pour diminuer le nombre d'expériences et d'animaux, des expériences ont été préalablement réalisées *in vivo* pour déterminer la dose maximale tolérée en termes de radioactivité injectée.

Raffiner : Les animaux utilisés au cours de cette expérience seront maintenus dans des conditions optimales (surveillance régulière de leur bien-être, enrichissement du milieu) et les lignées choisies sont représentatives des cancers neuroendocriniens de type CMT ou CPPC.

12891 La stimulation cérébrale profonde (deep brain stimulation, DBS), encore appelée neurostimulation, est une technique qui permet de modifier l'activité des neurones d'un endroit précis du cerveau via une électrode implantée chirurgicalement. Elle est actuellement proposée aux patients atteints de la maladie de Parkinson pour traiter les troubles moteurs invalidants (akinésie, rigidité, tremblement) avec un important succès. Elle est de plus en plus étudiée en vue d'applications cliniques dans d'autres maladies du système nerveux comme les maladies psychiatriques, par exemple les troubles obsessionnels et compulsifs, et plus récemment les troubles de la conscience (état de coma, ou état de conscience minimale qui se traduit par un réveil très faible après un accident cérébral grave).

Cependant, alors que l'effet de la neurostimulation est parfois spectaculaire, deux défis persistent :

1-l'identification de tous les mécanismes n'est pas encore connue : les effets de la DBS vont au-delà de la région ciblée par l'électrode, et il reste à identifier la dynamique cérébrale globale durant la DBS

2-il n'existe pas de modèle informatique global des effets cérébraux de la DBS. Or un tel modèle serait très précieux, car il pourrait prédire les effets de la DBS pour une région cérébrale donnée, offrant ainsi un rationnel avant de tester la neurostimulation dans une nouvelle application clinique.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de mener une étude pour analyser finement les mécanismes de la DBS dans le traitement de la maladie de Parkinson (application déjà validée dans le monde clinique) et ensuite développer des cibles de stimulation pour traiter les troubles de la conscience (application encore en cours de recherche). Partant des données acquises dans des modèles de ces deux maladies (maladie de Parkinson et troubles de la conscience) avec et sans DBS, une modélisation de manière informatique des effets de la stimulation cérébrale sur le cerveau de manière générale sera tentée.

Mais comment pourrait-on réaliser cette recherche ? Les espoirs se tournent vers l'IRM dite fonctionnelle (IRMf), qui consiste à utiliser la machine IRM habituelle pour observer localement les afflux de sang et donc l'activité d'un organe.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Ce travail nécessite le recours à l'expérimentation animale, aucun modèle informatique ou cellulaire mimant la complexité de ces pathologies n'existant à ce jour. Le modèle du primate non humain se justifie par les similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'humain, permettant une application plus adaptée aux pratiques cliniques.

Réduire : Ce projet implique 12 animaux, tous issus d'un élevage autorisé et dédié à l'expérimentation. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, le suivi au cours du temps des expériences ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des conditions appropriées pour préserver leur bonne santé et leur bien-être. Leur état de santé sera contrôlé très régulièrement par une équipe formée et soucieuse du bien-être animal tout au long de l'étude, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée à la moindre détection d'un signe de souffrance. Les méthodes expérimentales proposées comportent une définition de critères d'arrêt d'expérimentation en cas de signes de souffrance. De plus, les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par un vétérinaire et seront mis en œuvre par un médecin hospitalier formé à la préclinique. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis continuellement pour veiller à la bonne santé des animaux tout au long des expérimentations.

12892 Le changement climatique actuel a un effet significatif sur la persistance des organismes puisque l'extinction de populations en relation avec le changement climatique a été observée dans de nombreux taxa. De même, les activités humaines entraînent la destruction de nombreux habitats et une réduction/fragmentation des espaces naturels disponibles pour ces espèces. L'action conjointe de ces deux processus du changement global peut donc avoir un effet catastrophique sur le maintien de la biodiversité. En effet, l'augmentation de la fragmentation des milieux limite les mouvements des espèces et peut ainsi impacter les réponses attendues des espèces au réchauffement climatique. Les effets synergétiques du réchauffement climatique et de la fragmentation des habitats restent à ce jour mal connus, bien que leur compréhension soit cruciale pour prédire le devenir de certaines espèces et mettre en place des plans de conservation efficaces. L'objectif du projet est d'étudier les mécanismes de réponses des espèces au réchauffement climatique et à la fragmentation de l'habitat. Pour ce faire nous effectuons des suivis de lézards vivipares (*Zootoca vivipara*) de populations expérimentales soumises à des conditions thermiques et de connectivités différentes afin d'étudier les changements génétiques, morphologiques (taille, longueur des pattes, couleur), physiologiques (stress, microbiote intestinale) et comportementaux (activité, préférence thermique) au cours du temps des individus au sein de ces populations.

Le modèle d'étude est le lézard vivipare, espèce ectotherme dont la température corporelle dépend directement de la température extérieure, ce qui en fait une espèce particulièrement vulnérable face au réchauffement climatique. En tant qu'espèce modèle, elle nous permettra de généraliser nos conclusions à de nombreuses autres espèces de vertébrés ectothermes. Des études précédentes ont démontré que le lézard vivipare réagissait aux variations climatiques de son environnement, et était une espèce tout à fait adaptée pour vivre de longues périodes dans le dispositif expérimental semi-naturel que nous utilisons. Ceci en fait une espèce de choix pour cette étude, aussi bien scientifiquement qu'éthiquement.

Respect de la règle des 3R

Remplacer : Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle non vivant afin de pouvoir obtenir des prédictions précises de son devenir. Les lézards utilisés sont tous des descendants de lézards capturés en 2010, 2011 et 2012 dans les populations naturelles et sont maintenus en captivité depuis leur naissance dans un dispositif expérimental d'enclos semi-naturels de 100 m² dans lesquels la température et la connectivité peuvent être manipulés.

Réduire : Dans ce système, 16 populations de lézards, chacune initialement constituées de 10 femelles adultes, 5 mâles adultes et 19 juvéniles, vivent en autonomie toute l'année. Le nombre d'individus par population a été choisi pour mimer les densités présentes en milieu naturel. Le

nombre de populations a été déterminé pour avoir 4 répliques par condition de température-connectivité et pouvoir statistiquement se soustraire aux différences environnementales non contrôlées entre les différents enclos et ainsi pouvoir tirer des conclusions robustes de nos observations.

Raffiner : Tous les ans, les individus sont capturés, ramenés au laboratoire et gardés en terrariums individuels dans des conditions optimales respectant la réglementation européenne ainsi que les exigences biologiques de l'espèce. A la naissance et chaque année, nous réalisons sur les individus (250 adultes et < 400 juvéniles par an, soit 3250 sur 5 ans) des prélèvements d'un morceau de queue, de sang, et de microbiote intestinal et des mesures comportementales. Le prélèvement d'un petit morceau de queue, la queue de cette espèce se régénère rapidement, sera effectué sur les adultes et les juvéniles. Ce morceau permettra d'obtenir de l'ADN pour reconstruire les liens de parentés entre individus, faire des analyses de sélection au niveau du génome et déterminer leur régime alimentaire. Un prélèvement de sang sur les adultes uniquement permettra d'effectuer des mesures physiologiques quantifiant le stress et le vieillissement des individus en fonction du climat et de la fragmentation. La quantité du prélèvement est déterminée afin de permettre l'estimation précise de ces paramètres tout en ne mettant pas en péril la santé des individus. Des prélèvements de microbiote intestinal (lavement cloacal) seront effectués sur les adultes chaque année. Ces prélèvements réalisés avec du matériel stérile a été démontré comme étant non-invasifs. Finalement des tests comportementaux non-invasifs seront effectués en routine sur tous les individus chaque année afin d'estimer les préférences thermiques. Toutes ces procédures ne sont effectuées qu'une seule fois par an afin de minimiser leur impact sur la santé et le devenir des individus. De plus ils ont été montrés comme n'influençant pas la survie, la reproduction et la croissance des individus testés par rapport à ceux testés.

12893 Les décès liés au cancer sont principalement dus aux métastases, c'est-à-dire aux cellules cancéreuses qui se propagent à d'autres parties du corps que le site initial de la tumeur. Les cancers ayant un fort pouvoir métastatique sont très agressifs et souvent sans traitement satisfaisant. Le développement de stratégie thérapeutique empêchant le développement des métastases est un réel enjeu de santé public.

Il a été montré que certaines familles de protéines sont particulièrement impliquées dans l'invasion cellulaire. De plus, il a été montré depuis quelques années que les cellules tumorales produisent des vésicules jouant un rôle dans leur capacité à développer des métastases. Sur la base de ces résultats fondamentaux, nous proposons de développer une approche pour la thérapie des cancers très agressifs basée sur ces vésicules exprimant des molécules empêchant la croissance tumorale et le développement des métastases. Après des tests prometteurs *in vitro* réalisés sur des cellules tumorales dérivées de cancer du sein agressif (à fort pouvoir métastatique), nous souhaitons évaluer leur potentiel *in vivo* dans un modèle de cancer du sein chez la souris. Cette étape est un prérequis indispensable pour nous permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques avec une efficacité accrue dans ce type de pathologie.

Pour mener à bien ce projet, nous injecterons dans la glande mammaire de souris des cellules dérivées de tumeur du sein humaine (injection réalisée sous anesthésie générale). Nous testerons alors *in vivo* le bénéfice des nouveaux traitements comparés à des traitements utilisés classiquement en clinique humaine. Ces traitements seront administrés à des souris non anesthésiées (acte non douloureux) par voie intraveineuse ou intra-tumorale. Le traitement sera initié dès que la tumeur sera palpable. L'évolution de la maladie chez les souris ainsi que l'efficacité thérapeutique des drogues testées reposera sur la mesure de la taille de la tumeur ainsi que par des techniques d'imagerie *in vivo* non invasives réalisées sous anesthésie gazeuse, afin de visualiser les métastases. Les expériences d'imagerie seront réalisées de façon bi-hebdomadaire à partir de cinq semaines après l'injection des cellules cancéreuses. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 10 semaines après l'injection des cellules tumorales, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés. A terme, ce projet devrait permettre de contribuer à l'amélioration des thérapeutiques proposées aux patients atteints de cancer avec un fort pouvoir métastatique.

Respect de la règle des 3R,

Remplacer : Nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro*. Néanmoins, l'utilisation d'animaux est indispensable car malheureusement la capacité de former des métastases ne peut pas être évaluée *in vitro*.

Réduire : Au total, nous utiliserons dans ce projet 1120 souris sur une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum après estimation des effectifs basée sur les données antérieures du laboratoire et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables.

Raffiner : Une attention toute particulière sera également portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs. Nous veillerons aussi à réduire au minimum (intensité et durée) les souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, la taille des tumeurs, le poids et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduiront à l'euthanasie de la souris.

12894 Le succès à long terme des traitements anticancéreux dépend en grande partie de la capacité de rétablir l'immunosurveillance anticancéreuse. Des chimiothérapies telles que les anthracyclines ou l'oxaliplatine peuvent stimuler la mort cellulaire immunogène (MCI). Les cellules tumorales mourantes peuvent induire une réponse immunitaire puissante contre les cellules tumorales résiduelles impliquant les lymphocytes T cytotoxiques. Une caractéristique de la MCI est la production d'ATP via l'activation de l'autophagie.

Ce projet a pour but de caractériser *in vivo* une molécule capable d'induire la MCI *in vitro*. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences d'évaluation de processus impliqués dans la MCI (autophagie) et de croissance tumorale.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de la règle des 3R

Remplacer : Ce projet a pour objectif de tester l'efficacité de nouveaux traitements anti-cancéreux (identifiés *in vitro*) qui induisent la MCI, selon un mécanisme impliquant le système immunitaire. Il est actuellement impossible de reconstituer le système immunitaire *in vitro/ex vivo* du fait de sa complexité. Il est donc absolument nécessaire pour ce projet d'utiliser un modèle *in vivo*. Nous avons choisi le modèle souris car notre projet s'applique à étudier l'implication de l'immunité dans la lutte anti cancéreuse chez le mammifère.

Réduire : Ce projet, d'une durée maximale de 3 ans, impliquera l'utilisation de souris (n=620). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales s'avèrent négatives par rapport à l'hypothèse de travail.

Les animaux recevront des greffes de tumeurs en sous-cutanée, une seule par animal. Les tumeurs seront surveillées quotidiennement et mesurées tous les deux jours.

Raffiner : Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont observés quotidiennement afin de détecter tout problème ou anomalie. La mise en place d'une grille de score pour un suivi strict permettra d'appliquer précocement des points limites afin d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

12895 Le but de ce projet est de créer et de caractériser un modèle animal qui présente une réduction de l'expression de la dynamine 2 musculaire, et d'étudier l'éventuelle efficacité thérapeutique que celle-ci pourrait avoir pour la myopathie centronucléaire. La myopathie centronucléaire est une maladie rare sévère caractérisée par une importante faiblesse. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes impliqués dans le muscle, nous avons dans un premier temps utilisé des expériences *in vitro* (REEMPLACER). Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la

physiologie et la pathophysiologie *in vivo*. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies, nous prévoyons d'utiliser un modèle souris n'exprime pas la dynamine 2 musculaire qui est spécifiquement exprimée dans le muscle et est impliquée dans la myopathie centronucléaire. L'utilisation de ce modèle souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie *in vivo*.

Nous avons précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Nous avons développé deux approches utilisant d'une part un croisement génétique dans le but de diminuer l'expression de dynamine 2 de 50%, et d'autre part une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable aussi de diminuer le niveau de dynamine 2. Chez des souris malades exprimant 50% de dynamine 2 ou injectées avec le composé, nous avons obtenu leur rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie. La dynamine 2 est exprimé dans tout l'organisme mais il y a un type de dynamine 2 exprimé de façon spécifique dans le muscle. Notre but est d'une part de déterminer le rôle de ce type de dynamine 2 musculaire, et d'autre part d'étudier sa possible utilisation comme cible thérapeutique contre la myopathie centronucléaire pour éviter tout possible effet secondaire de la diminution de la dynamine 2 sur d'autres organes.

Nous avons préalablement étudié l'effet de l'isoforme de la dynamine 2 dans des modèles cellulaires pour réduire au maximum le nombre d'animaux mais seulement le modèle murin nous permet d'observer son rôle sur la maturation et structure du muscle ainsi que pour déterminer son effet thérapeutique contre la myopathie centronucléaire (REMPACER). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une PE/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris. 15 souris seront utilisées pour chaque expérience. 15 souris maximum / groupe seront utilisées pour s'assurer que l'étude soit statistiquement et scientifiquement valable. Un maximum de 1643 souris sera utilisé. En effet, le projet s'articule en 3 séquences. Selon les résultats de la première séquence, nous poursuivrons ou non les expériences des 2 séquences suivantes. (REDUIRE)

Afin de préserver le bien-être des animaux, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur ou inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur ou inconfort observé (soit modification dans l'alimentation pour une nourriture en gel, soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront sortis de l'étude) (RAFFINER).

12896 L'aquaculture a connu un essor considérable au cours des dernières décennies (en moyenne +6% par an) mais l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) compte sur l'aquaculture pour poursuivre sa croissance et nourrir plus de 9 milliards de personnes à l'horizon 2050. La disponibilité de plus en plus limitée de la farine et de l'huile de poisson qui sont les ingrédients traditionnels utilisés dans les aliments pour poissons, pourrait venir compromettre le développement durable de l'aquaculture. Des efforts ont été déployés pour remplacer la farine de poisson et l'huile de poisson par des végétaux mais leur introduction à de trop forts taux dans l'alimentation des poissons, réduit considérablement la croissance des poissons en affectant principalement la prise alimentaire. Il est donc essentiel de mieux comprendre comment la prise alimentaire est régulée chez les poissons carnivores comme la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) pour pouvoir mettre en place des stratégies d'élevage et d'alimentation qui favoriseront la prise alimentaire et les performances de croissance des poissons.

De nombreuses études réalisées chez les mammifères montrent que la prise alimentaire est régulée par certains nutriments apportés par l'alimentation comme les acides aminés mais aussi par des paramètres environnementaux tels que l'oxygène. Afin de proposer aux pisciculteurs de nouvelles recommandations pour produire de la truite arc-en-ciel, nous avons besoin d'étudier comment la leucine qui est un acide aminé et le taux d'oxygène dissous dans l'eau influencent la prise alimentaire de la truite arc-en-ciel.

La régulation de la prise alimentaire est un phénomène complexe dont le cerveau est le centre névralgique. Informé de l'état physiologique de l'animal par le biais de signaux nerveux, hormonaux

ou métaboliques, le cerveau déclenche en retour des signaux moléculaires pour inhiber ou induire la prise alimentaire. Nombre de ces mécanismes existent et ont été décrits chez les poissons mais leur régulation par les acides aminés ou bien par la quantité d'oxygène dissous dans l'eau reste à caractériser.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'influence de ces deux paramètres sur la consommation alimentaire de la truite et de caractériser les signaux moléculaires déclenchés par ces facteurs pour réguler la prise alimentaire. Nous savons que les acides aminés et le taux d'oxygène sont capable d'influencer la prise alimentaire en activant respectivement le facteur inductible par l'hypoxie (protéine HIF) et la protéine mTOR. Ces mécanismes sont connus chez les mammifères mais pas chez les poissons. Nous proposons d'examiner si ces deux protéines participent à la régulation de la prise alimentaire chez la truite.

Avec ce projet, nous espérons répondre aux questions suivantes :

1. Un apport important de leucine par le biais de l'aliment peut-il entraîner un changement de la prise alimentaire de la truite ?
2. Le taux d'oxygène dissous dans l'eau influence-t-il aussi la prise alimentaire ?
3. Les protéines mTOR et HIF jouent-elles un rôle dans la régulation de la prise alimentaire de la truite ?

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Cette expérimentation concerne la prise alimentaire chez la truite, elle ne peut donc pas être étudiée avec des cellules ou des modèles mathématiques. Le nombre de poissons a été calculé au plus juste au regard des analyses à mener et tous les poissons feront l'objet d'un prélèvement et d'analyses.

Réduire : Pour répondre à ces questions, nous avons besoin de mettre en place un essai d'alimentation pendant 3 semaines en utilisant au total 330 poissons.

Raffiner : Les truites seront élevées dans nos installations expérimentales dans des conditions d'élevage optimales garantissant leur bien-être. L'expérimentation comprendra six traitements avec 3 bassins par traitement et 18 truites par bassin. Les truites seront placées dans des bassins contenant plus ou moins d'oxygène dissous dans l'eau et seront nourries avec un aliment contenant un taux de leucine répondant à ses besoins nutritionnels ou supérieur à ses besoins. Les truites élevées dans des conditions de plus forte oxygénation de l'eau seront nourries à satiété ou restreintes de façon à ce qu'elles mangent la même quantité d'aliment que celles élevées dans une eau moins oxygénée.

La saturation en oxygène de l'eau du circuit alimentant les bassins sera de 100%. Les niveaux d'oxygène dissous dans les bassins seront déterminés à l'aide d'un oxymètre au moins deux fois par jour. Ces niveaux seront réglés en modulant le débit d'alimentation en eau et l'aération des bassins de façon à maintenir une saturation en oxygène de 100% ou de 60% en fonction des traitements. Il est important de mentionner qu'un taux d'oxygène dissous de 60% n'entraîne aucun effet dommageable chez la truite arc-en-ciel. Néanmoins, un suivi quotidien de la prise alimentaire et du comportement de l'animal (hyperventilation, perte de l'équilibre, nage anormale) permettra de s'assurer du bien-être des poissons tout au long de l'expérimentation.

Les poissons seront alimentés manuellement deux fois par jour jusqu'à satiété visuelle et nous mesurerons la quantité d'aliment distribué dans chaque bassin. Pendant toute la durée de l'expérience les poissons seront nourris avec des aliments répondant parfaitement à leurs besoins nutritionnels. Nous prélèverons des animaux avant le début de l'expérience, au bout de 7 jours et à la fin de l'expérience. Tous les prélèvements seront effectués sur animaux morts et les échantillons seront utilisés pour des analyses de laboratoire. Pour les prélèvements, les poissons seront pêchés avec une épuisette, anesthésiés immédiatement dans un seau pour éviter le stress puis euthanasiés avec des doses élevées d'anesthésiques.

12897 L'arthrose est la pathologie du cartilage articulaire la plus fréquente. Avec le vieillissement de la population et la pratique grandissante du sport, cette pathologie est devenue un problème majeur

de santé publique entraînant invalidité et absentéisme avec un coût croissant pour la société. Les origines de cette pathologie sont complexes et mal comprises. L'une des raisons vient du fait que le cartilage articulaire est un tissu avasculaire et non innervé dont le potentiel régénératif est très faible ce qui se traduit par une érosion progressive et irrémédiable du cartilage. Cette pathologie est d'origine plurifactorielle avec une composante mécanique prépondérante. L'articulation est un environnement composé de plusieurs tissus différents qui rend l'approche *in vitro* particulièrement inopérante pour comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de l'arthrose. De plus les contraintes mécaniques auxquelles le cartilage est soumis sont elles aussi difficiles à reproduire ce qui explique le recours à l'expérimentation animale.

Il existe un modèle de choix permettant de reproduire au mieux l'arthrose humaine, notamment son caractère progressif. Elle est appelée arthrose post-traumatique et est aujourd'hui communément utilisée par les équipes de recherche travaillant sur cette pathologie. Elle consiste à effectuer une déstabilisation du ménisque médian (DMM) par incision de ce dernier (ménisectomie partielle), entraînant une déstabilisation de l'articulation et provoquant une arthrose apparaissant progressivement.

Le projet consiste à tester l'implication d'une enzyme dans le développement de l'arthrose et a pour but d'induire l'arthrose chez des souris génétiquement modifiées (expression de cette enzyme spécifiquement invalidée dans le cartilage articulaire).

Il y aura plusieurs conditions : l'invalidation du gène sera réalisée à 2 moments de la pathologie. Le premier moment se situe avant le déclenchement de la pathologie donc avant la chirurgie, afin d'évaluer l'impact sur le déclenchement de la pathologie. Le deuxième se fera au cours de la pathologie afin d'évaluer l'impact sur la progression de la pathologie. 2 temps seront analysés: 4 semaines et 8 semaines après DMM. Ce projet concerne un nombre total de 290 souris.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Les expériences *in vivo* sont une étape inévitable dans ce projet. L'exploration fonctionnelle d'une articulation humaine est limitée aux examens radiologiques. L'induction d'arthrose chez la souris est à ce jour la seule possibilité pour l'étude des mécanismes physiopathologiques. De plus le choix le plus pertinent pour comprendre cette maladie est l'utilisation de souris génétiquement modifiées.

Réduire : Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chances d'obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles.

Raffiner : Une procédure d'anesthésie adaptée sera effectuée avant chirurgie. Les souris se verront administrer un traitement antalgique afin de limiter la douleur. Des points limites adaptés seront utilisés afin de vérifier le bien être des souris.

12898 Bien que peu fréquent (entre 0,1 et 1 événement pour 1000 plongées ; ≈400 cas/an en France), l'accident de décompression (ADD) se traduit par des symptômes pouvant aller de la simple démangeaison passagère au décès. 20 à 30% des plongeurs atteints d'ADD conservent une invalidité permanente. L'ADD représente ainsi le risque le plus grave chez les plongeurs subaquatiques professionnels et de loisir, mais concerne aussi l'ensemble des personnes exposées à des diminutions de pression importantes : patients et personnels des chambres hyperbares, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers.... Depuis les travaux de Paul Bert, il est admis que l'ADD est la conséquence de la formation de bulles dans la circulation sanguine pendant et après la décompression. Les paliers qu'effectuent les plongeurs lors du retour vers la surface visent à prévenir cet accident en diminuant la formation de bulles intravasculaires. Cependant, des ADD continuent d'être rapportés malgré le respect des procédures de décompression, soulignant l'intérêt d'améliorer la prévention et le traitement de cette pathologie.

Il est largement accepté que certains plongeurs sont plus sensibles que d'autres à l'ADD sans qu'on en connaisse encore l'origine, et que seule 13% de cette variabilité interindividuelle est expliquée par la formation des bulles intravasculaires. La capacité des bulles à générer un ADD serait donc

dépendante de l'intervention de facteurs individuels, qui restent à découvrir. En utilisant un modèle murin, notre équipe a montré qu'il est possible de diviser par 3 la proportion d'ADD par un programme d'élevage sélectif des individus résistants. Outre la mise en évidence d'une part héréditaire de cette résistance, ce programme a montré qu'il est possible de créer un modèle murin de résistance à l'ADD, indispensable pour mieux en cerner les mécanismes physiopathologiques.

L'objectif de ce projet est donc (i) : de poursuivre le programme de sélection pour aboutir à une souche murine stabilisée et (ii) : identifier les caractéristiques individuelles (physiologiques et génétiques) associées à cette résistance.

Dans ce but, des rats seront soumis à des plongées fictives en chambre hyperbare. Les individus résistants à l'ADD seront alors sélectionnés pour la reproduction afin de maintenir une lignée spécifiquement résistante à celui-ci. Après sevrage de leurs descendants, les parents résistants à l'ADD seront mis à mort pour réaliser des analyses physiologiques et génétiques. Celles-ci permettront une meilleure compréhension des mécanismes de l'ADD ainsi que la possibilité d'identifier des individus résistants (ou susceptibles) à l'ADD.

A travers les différentes procédures, 2200 rats issus du programme d'élevage sélectif, et 51 reproducteurs de lignées « sauvages » seront utilisés dans le cadre de ce travail scientifique. Conformément à la règle des 3R,

- remplacer : le remplacement n'est pas possible ici puisque notre objectif est de stabiliser la souche murine résistante à l'ADD et d'obtenir un modèle d'ADD.
- réduire : Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en limitant à la fois l'effectif de chaque génération et le nombre de générations (minimum nécessaire pour permettre la sélection d'un trait phénotypique complexe).
- raffiner : après une plongée, l'ADD est induit ou pas. Lorsqu'il apparaît chez l'animal, notre expérience nous a permis de déterminer des points limites prédictifs et fiables dans les 10 premières minutes qui suivent l'ADD, ce qui limite la souffrance des animaux.

12899 La cicatrisation des plaies cutanées est un phénomène naturel de reconstruction de la barrière cutanée mais si les plaies sont mal soignées, cela peut aboutir à des complications. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition de la lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines. On distingue 4 stades dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées, faisant suite à une phase inflammatoire au cours de laquelle la lésion est recouverte par un caillot sanguin : (1) la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants permettant l'apport en nutriments et oxygène, indispensables aux cellules, (2) la phase de migration au cours de laquelle le caillot sanguin devient une croûte en raison de la prolifération des filaments de fibrine, c'est le début de l'élaboration de la cicatrice, et sous la croûte les vaisseaux vont proliférer, (3) la phase de prolifération, massive, de cellules, de vaisseaux sanguins et de fibres, et enfin (4) la phase de maturation, phase la plus longue qui peut se poursuivre pendant plus d'un an, avec au début la croûte qui tombe et la peau qui va retrouver ses différentes couches.

Les plaies chroniques représentent un fardeau pour les patients, surtout ceux atteints de diabète, les professionnels de la santé et les systèmes de soins de santé, affectant plus de 40 millions de patients et induisant des coûts d'environ 50 milliards d'euros annuellement.

Il est donc très important de tester de nouvelles substances, de nouveaux pansements ou de nouveaux dispositifs médicaux sur des modèles de plaies simples et chroniques représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation de ces plaies.

L'objectif de notre projet est d'évaluer la tolérance locale et l'efficacité sur la cicatrisation d'un nouveau pansement développé dans le but de traiter l'ulcère veineux de la jambe et l'ulcère du pied diabétique. Le principe actif incorporé dans ce nouveau pansement est connu pour avoir des propriétés antimicrobiennes et induire une accélération de la croissance cellulaire des cellules de

la peau (kératinocytes fibroblastes) selon des tests effectués *in vitro* sur des modèles de peau reconstruite.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Ce projet réalisé sur des animaux vivants fait suite à des études *in vitro* sur modèles de peau reconstruite car il n'est pas possible d'utiliser ces modèles *in vitro* pour évaluer la tolérance et l'efficacité de pansements sur des plaies cutanées chroniques.

Réduire : Pour ce projet qui constitue la toute première évaluation *in vivo* de ce nouveau pansement, nous n'utiliserons que 20 rats mâles Wistar d'un poids de 275-300 g (10-12 semaines d'âge) répartis en 2 groupes de 10 rats chacun. Une précédente étude réalisée avec un nouveau dispositif médical favorisant la cicatrisation et avec le même nombre d'animaux a en effet permis d'obtenir des résultats significatifs sur les différents paramètres évalués.

Raffiner : Après une période de quarantaine et d'acclimatation de 7 jours, une plaie cutanée sera induite, sous anesthésie gazeuse, par excision cutanée sur le dos de l'ensemble des animaux (Procédure 1). Un pansement sera appliqué sur la plaie cutanée induite, maintenu en place à l'aide d'une bande de sparadrap, avec un renouvellement 3 fois par semaine jusqu'à cicatrisation complète. Un groupe sera traité avec le nouveau pansement contenant l'actif favorisant la cicatrisation, l'autre groupe étant traité avec le même pansement mais dépourvu de l'actif (Procédure 2). Des observations de la plaie cutanée induite et du tissu cutané environnant effectuées lors de chaque change de pansement permettront d'étudier la tolérance de ce nouveau pansement. Des paramètres seront ainsi scorés au niveau de la plaie cutanée induite et du tissu cutané environnant, ainsi que le comportement des animaux, la détermination de la surface de la plaie cutanée, avec prise de photos, sans nécessité d'anesthésier les animaux (Procédure 3).

Les animaux seront placés en cage individuelle (18. 9 x 29. 6 x 12. 8 cm) pour éviter qu'ils ne s'arrachent entre eux le pansement testé et la bande de sparadrap permettant son maintien en place, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des briques en bois à rogner (briques d'Aspen) seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré 3 fois par semaine à chaque renouvellement de pansement, et si une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids maximal est observée ou si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (cachexie, vocalises, convulsions...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques.

A la fin de l'expérimentation, après cicatrisation complète de la plaie cutanée, l'ensemble des animaux sera mis à mort par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique et un prélèvement cutané sera effectué au niveau de la zone d'induction de la plaie cutanée pour la réalisation d'analyses biologiques.

12900 La maladie de Parkinson (MP) se situe au second rang des maladies neurodégénératives les plus communes. En début de maladie, elle se caractérise par la dégénérescence des neurones d'une structure cérébrale particulière : la substance noire partie compacte (SNpc). Cette structure communique avec le striatum grâce à la sécrétion d'un neurotransmetteur : la dopamine. La SNpc fait partie d'un ensemble de noyaux cérébraux responsables de la mémoire motrice : les ganglions de la base. Les symptômes moteurs majeurs de la MP sont la lenteur à initier les mouvements (bradykinésie), la rigidité musculaire, et l'instabilité posturale. Il existe différents modèles murins de la MP : certains font intervenir des outils pharmacologiques, d'autres des outils génétiques. Dans notre précédente étude, l'utilisation d'un modèle pharmacologique obtenu par l'injection d'une toxine dans le striatum, nous a permis de mettre en évidence que l'administration orale de Bumétanide pendant un mois améliore significativement les troubles moteurs présents dans ce modèle.

Dans le cerveau, la communication inhibitrice entre les neurones s'effectue essentiellement grâce au neurotransmetteur GABA (gamma-aminobutyric acid). En se fixant sur son récepteur GABA A, le GABA entraîne un flux d'ions chlorures dont le sens est déterminé par la concentration en cet ion

de part et d'autre de la membrane. En effet, en condition physiologique chez l'adulte, la concentration intracellulaire en ions chlorures a tendance à être basse et le flux passif d'ions chlorures est entrant, entraînant ainsi une inhibition de l'activité neuronale. Dans de nombreuses pathologies, la concentration intracellulaire en ions chlorures des neurones augmente, le flux s'inverse et l'inhibition via les récepteurs GABA A disparaît. Nous voulons tester le potentiel thérapeutique de la Bumétanide, un bloquant du transporteur NKCC1, importeur des ions chlorures dans les cellules y compris les neurones. Ainsi, la Bumétanide diminue la concentration intracellulaire en ions chlorures et restaure l'inhibition médiée par le récepteur GABAA, récepteur-canal perméable aux ions chlorures.

Dans ce projet nous souhaitons évaluer les possibles effets positifs de la Bumétanide sur le comportement moteur et la protection des neurones dopaminergiques de la SNpc vis-à-vis de la neurodégénérescence dans un modèle murin obtenu par la surexpression de l'alpha-synucléine (a-synucléine) par l'injection d'un virus dans la substance noire (SN). En effet, quelle que soit l'étiologie de la MP, on constate une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc et le plus souvent, la présence de dépôts anormaux d'alpha-synucléine (corps de Lewy) dans ces neurones. Divers processus pathologiques convergent ainsi vers l'a -synucléine qui serait un acteur clé de la pathogenèse neuronale. L'injection d'un vecteur viral permettant la surexpression de l'alpha-synucléine humaine chez la souris est un modèle progressif de la MP, (à la différence du modèle pharmacologique qui constitue un modèle aigu) ce qui rend possible l'étude des facteurs qui peuvent réduire le processus dégénératif progressif.

Ce projet nécessitera 154 souris adultes. Avant les expériences, les animaux seront hébergés dans des cages enrichies (placement de buchettes de bois, dôme-home, nids-végétal ou tunnels dans les cages) et dans un environnement avec température, lumière et hygrométrie contrôlées avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau.

Remplacer : A notre connaissance, seuls les modèles mammifères peuvent reproduire de façon progressive les signes moteurs et cellulaires de la MP. De plus, nous voulons étudier l'effet de la Bumétanide sur des comportements moteurs complexes, ce qui exclut l'utilisation de modèles *in vitro* ou d'espèces animales moins complexes.

Réduire : Les mêmes animaux seront utilisés pour réaliser les investigations comportementales et histologiques. De plus, les mêmes échantillons biologiques seront utilisés pour évaluer différents marqueurs histologiques réduisant le nombre d'animaux nécessaires. Nous analyserons nos données au fur et à mesure des expériences, permettant d'éviter des expériences inutiles.

Raffiner : Avant et pendant les expériences, les animaux seront hébergés dans des cages standards enrichies (placement de buchettes de bois, dôme-home, nids-végétal ou tunnels dans les cages), et dans un environnement avec température, hygrométrie et lumière contrôlées (cycles 12 heures jour/ 12 heures nuit). Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Avant toute chirurgie une combinaison d'anesthésiques et de sédatifs sera administrée, ainsi qu'un analgésique en pré- et post-opératoire. Pendant l'intervention chirurgicale, la température corporelle de l'animal sera monitorée et régulée grâce à une sonde rectale et un tapis chauffant. Pour éviter toute souffrance, des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12901 Nous proposons de former de nouveaux chercheurs sur les méthodes modernes de mesure d'activités neuronales impliquées dans les mécanismes d'apprentissage discriminant, d'exploration de nouveaux contextes et de la codification des informations sensorielles. Ce projet a aussi pour but de former les étudiants afin qu'ils soient en mesure de réaliser au mieux les procédures qu'ils auront apprises et transmettre ainsi ces techniques dans leur laboratoire d'origine. Une meilleure connaissance des nouvelles techniques de chirurgie et d'imagerie leur permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés lorsqu'ils voudront réaliser ces techniques pour leurs besoins de recherche.

- Apprentissage discriminant :

Notre vie quotidienne est une chaîne complexe et discontinue de décisions et d'actions qui définissent nos comportements. Face à une situation de choix, chaque individu tendra à sélectionner la meilleure action possible parmi l'ensemble des alternatives possibles. Ce processus intervient sur la base d'une évaluation subjective propre à chaque individu des coûts et bénéfices de chaque action. Différents circuits corticaux ont été identifiés comme des acteurs potentiels de ce processus, cependant les mécanismes synaptiques et neuronaux restent peu connus à ce jour.

Nous proposons d'étudier chez la souris vivante et éveillée ces divers mécanismes. Les animaux impliqués dans ce projet subiront deux chirurgies (injection virale et implantation du système de maintien de la tête) puis, 3 semaines après, des tests comportementaux associés à l'électrophysiologie et l'optogénétique permettront de mettre en évidence, les circuits neuronaux impliqués dans cette tâche et d'en extraire les mécanismes neuronaux sous-jacents.

- Exploration de nouveaux contextes :

La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe, impliquée dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes ou mémoire épisodique. L'hippocampe est une des premières structures atteintes dans la maladie d'Alzheimer, ce qui explique les problèmes de mémoire et de désorientation qui caractérisent l'apparition de cette pathologie neurodégénérative.

Le projet propose d'étudier le fonctionnement des circuits de l'hippocampe dans un contexte physiologique à l'échelle cellulaire ainsi qu'à l'échelle plus globale du réseau de neurones. Elle permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine de l'encodage et la consolidation de la mémoire.

Pour cela, les animaux employés subiront deux chirurgies (injection virale et implantation de l'appareillage d'imagerie calcique) puis 2 semaines après, des expériences seront réalisées sur les souris éveillées et libre de leurs mouvements au cours d'une tâche comportementale.

- Codification des informations sensorielles :

Le système nerveux reçoit les différents messages sensoriels de l'environnement immédiat qui sont perçus par nos différents récepteurs sensoriels. L'information reçue est modulée afin de permettre l'intégration et l'organisation de celle-ci en une réponse comportementale en lien avec le stimulus perçu initialement. Le traitement de l'information sensorielle permet donc de bien identifier et d'organiser les différents types de sensations possibles provenant des différents systèmes sensoriels.

Des structures cérébrales comme le cortex sensoriel et le thalamus ont un rôle crucial dans la codification de l'information sensorielle. La dynamique de ces réseaux ainsi que leurs modes de fonctionnement exact sont loin d'être connus.

Les méthodes *in vivo* comme l'imagerie bi-photonique permettent d'enregistrer l'activité des circuits corticaux sur les souris anesthésiées, de définir les relations fonctionnelles à l'intérieur de ces circuits neuronaux et de mieux comprendre leurs implications dans la codification de l'information.

Les techniques modernes de neuroimagerie telles que l'imagerie bi-photonique et les miniscopes ont révolutionné le domaine des neurosciences cognitives en permettant de mesurer de façon non invasive l'activité cérébrale de façon chronique. Par leur intermédiaire, il est possible de quantifier les relations entre différents types de cellules ou entre les couches corticales à l'intérieur de réseaux neuronaux. Les deux techniques permettent d'étudier les circuits neuronaux avec une résolution sous-cellulaire et de les suivre pendant que l'animal apprend ou exécute une tâche comportementale.

Dans le respect de la règle des 3R:

Remplacer : Pour comprendre l'activité des circuits neuronaux dans le cerveau, il est nécessaire de générer des données biologiques pertinentes. L'utilisation d'animaux est donc inévitable. Les souris sont les modèles animaux de prédilection pour les recherches dans ce domaine en raison de la structure anatomique et de la fonction bien définies de différents cortex corticaux. La souris est aussi l'espèce de rongeurs qui permet d'obtenir aisément des animaux modifiés génétiquement.

Réduire : L'expertise de nos instructeurs depuis 15 ans sur ces modèles garantit que le nombre d'animaux utilisés est minimisé par une pratique toujours de haute qualité dès le départ. De même il est extrêmement important pour nos objectifs éducatifs de pouvoir démontrer et mettre en pratique les actes de préparation chirurgicaux, le nombre d'animaux sera donc adapté en conséquence. La durée de ce projet de formation est de 5 ans et nous utiliserons un nombre total de 315 souris (200 de lignée sauvage C57BL/6J et 115 de lignées transgéniques sans phénotype dommageable).

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

12902 Le déconditionnement musculaire, qui désigne une perte de masse et de force musculaire, peut être observé dans différentes situations physiologiques et surtout pathologiques (cancer, myopathie, insuffisances cardiaque, rénale ou respiratoire).

Dans le cas du cancer, ce déconditionnement musculaire est extrêmement marqué (on parle de cachexie associée au cancer) et constitue un facteur majeur contribuant à la réduction de l'état de santé et de la qualité de vie des patients.

Les acteurs moléculaires de ce déconditionnement musculaire agissent essentiellement sur 2 mécanismes : la synthèse des protéines (anabolisme) et/ou la dégradation des protéines (catabolisme).

Une augmentation de l'anabolisme favorise un gain de masse musculaire par augmentation de la synthèse de protéines dans le muscle (hypertrophie). A l'inverse, une augmentation du catabolisme entraîne une perte de masse musculaire (atrophie) par activation des mécanismes de dégradation des protéines musculaires (protéolyse). Les glucocorticoïdes constituent une famille d'hormones largement utilisées en clinique pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Mais les glucocorticoïdes sont également des acteurs du déconditionnement musculaire, en raison de leur propriétés anti anaboliques et pro cataboliques. L'implication fonctionnelle des glucocorticoïdes dans la cachexie associée au cancer est largement méconnue.

Dans ce contexte, notre hypothèse générale est que les glucocorticoïdes sont des acteurs du déconditionnement musculaire dans le cancer.

Notre objectif ici est de déterminer si l'administration de RU486, un inhibiteur du récepteur aux glucocorticoïdes, permet de prévenir ou de limiter le syndrome cachectique. Ces travaux de recherche seront effectués chez la souris mâles ApcMin/+, animal de référence pour ce genre d'approche et déjà largement utilisé au Laboratoire. L'utilisation de cette lignée nous permet de bien connaître l'évolution de la maladie et de mettre en place la surveillance de différents points limites pour le respect du bien-être animal. RU486 sera implantée sous forme de capsule sous anesthésie générale en sous-cutané (taux de diffusion de la drogue 0,80 µg/heure/g) chez des souris ApcMin/+ pré cachectiques (âgées de 10 semaines) et des souris ApcMin/+ cachectiques (âgées de 15 semaines). Des souris sauvages et des souris ApcMin/+ contrôles recevront la capsule sans la drogue (placébo). A l'âge de 23 semaines, les souris subiront une anesthésie chimique sans réveil afin de prélever les muscles qui seront ensuite conditionnés et stockés pour des analyses histologiques et biochimiques ultérieures. Le cerveau des animaux sera également prélevé et conditionné pour des analyses ultérieures. Dans le respect de la règle des 3R:

Remplacer : Le déconditionnement musculaire associé au cancer met en jeu un processus multifactoriel sollicitant de nombreux tissus. Un système expérimental *in vitro* ne permettrait pas de reproduire la complexité de ces régulations. Seul un modèle animal peut reproduire la complexité du phénomène.

Réduire : Au total et à raison de n=30 souris par groupe de souris ApcMin/+ et n=30 pour le groupe de souris de type sauvage, 120 souris seront utilisées pour obtenir des résultats significatifs.

Raffiner : Pendant toute la durée du protocole, chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Par ailleurs, les animaux seront hébergés

en groupes harmonieux (par 2) dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture seront mises à disposition "ad libitum" et de la musique sera diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

12903 L'apparition de la puberté chez les femelles constitue un facteur limitant de la diffusion du progrès génétique, qui est un levier majeur de la compétitivité des élevages bovins. Elle est fortement liée au développement corporel des animaux ; des études antérieures ont montré qu'il était possible d'avancer significativement l'âge à la première ovulation des génisses en jouant sur leur nutrition pendant des étapes clés de leur croissance pré-pubertaire. Toutefois, les limites biologiques de ces phases de puberté et de reproduction précoces sont encore inconnues, de même que la capacité de ces génisses précoces à produire des embryons et également les conséquences de cette pratique sur la carrière ultérieure de l'animal et de sa descendance. Le projet global aura pour objectif d'apporter des éléments de réponse concrets à cette problématique. Il évaluera les performances obtenues par deux plans d'alimentation en mesurant sur des femelles Holstein divers paramètres liés à la croissance et au développement des tissus musculaires/adipeux/glande mammaire, à la reproduction, et à d'autres performances zootechniques suivies sur l'ensemble de la carrière des animaux (production laitière, santé). Les descendants des animaux suivis en première génération seront soumis au même protocole que leurs mères (prélèvements et régimes nutritionnels différenciés) dans le but de mettre en évidence d'éventuels effets transgénérationnels.

Dans le cadre du projet global, l'expérimentation qui fait l'objet de cette saisine établira l'impact des régimes différenciés pendant la période de croissance sur l'activité ovarienne et la qualité des ovocytes. Pour ce faire, après le sevrage à 9 semaines et la mise en place des régimes différenciés, des ovocytes seront collectés sur des animaux aux âges de trois mois et six mois. Le régime différencié sera maintenu pendant la croissance des génisses, jusqu'à la mise à la reproduction par insémination. A la génération suivante, des ovocytes seront collectés pour mettre en évidence (ou non) un effet trans-générationnel. Les ovocytes seront comparés sur des paramètres morphologiques, en particulier le diamètre, le contenu en organites et gouttelettes lipidiques et leur distribution spatiale dans l'ovocyte, et sur l'expression de gènes.

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

Remplacer : Cette expérimentation vise à collecter des ovocytes de veaux pour préciser l'impact précoce du régime alimentaire sur la qualité des ovocytes. Il n'existe pas de modèle mathématique prédictif adéquat, l'utilisation d'animaux est indispensable.

Réduire : Cette demande concerne 28 animaux, soit 7 animaux pour chacun des deux groupes alimentaires de la première génération, et 2x7 animaux de la deuxième génération. Cet effectif permettra d'assurer la collecte de matériel suffisant en prenant en compte d'une part la variabilité interindividuelle attendue en termes de nombre de follicules ovariens de plus de 3mm (estimé entre 5 et 60 par individu d'après des expérimentations antérieures), d'autre part le taux de collecte d'environ 50%.

Raffiner : L'intervention se déroulera sous anesthésie générale. Une intubation sera réalisée pour éviter tout reflux gastrique et un suivi constant de la température, du rythme cardiaque et de la respiration des animaux sera effectué par monitoring. Ceci sera complété par une anesthésie locale et l'administration d'analgésiques et d'anti-inflammatoires. Les animaux seront élevés dans une nurserie répondant aux normes en vigueur sur le plan du bien-être animal (aires paillées, automates d'alimentation lait, eau et concentré céréaliers avec suivi des consommations journalières individuelles, colliers d'activité, brosses latérales et dorsales).

12904 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Au niveau cérébral, les symptômes ont été associés par une perte de neurones produisant la dopamine dans une région du cerveau. Cependant l'origine de cette maladie est encore mal connue. De nouvelles données suggèrent que l'accumulation anormale d'une protéine, dénommée l'alpha synucléine dans les neurones, serait une des causes

de la mort des neurones dopaminergiques. Ce mécanisme, aujourd'hui mal compris, est considéré comme central dans la genèse et l'évolution de la maladie. Sa compréhension est donc essentielle dans le développement de nouveaux outils thérapeutiques à l'identification d'un nouveau composé thérapeutique.

Un modèle de maladie de Parkinson de surexpression d'alpha-synucléine dans le cerveau des rongeurs entraîne les symptômes typiques de la maladie de Parkinson et la perte des neurones dopaminergiques. L'objectif de notre étude est d'utiliser ce modèle de maladie de Parkinson chez le rat et d'étudier l'effet neuroprotecteur d'un nouveau composé :

- sur les symptômes de la maladie de Parkinson.
- sur les neurones dopaminergiques.

Notre stratégie est d'induire la maladie de parkinson en effectuant des injections stéréotaxiques de ce vecteur viral exprimant l'alpha synucléine dans le cerveau des rats et de les traiter chroniquement pendant 8 semaines avec un nouveau composé. Afin d'observer l'effet de ce composé sur la maladie de parkinson, le comportement moteur des animaux sera évalué. Les animaux seront mis à mort 9 semaines après les chirurgies stéréotaxiques et des analyses histologiques et neurochimiques seront faites afin de visualiser l'effet du composé sur la perte des neurones dopaminergiques.

Dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacer : L'analyse des effets pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement par des modèles *in vitro* actuels ne permettrait pas de répondre à notre question.

Réduire : Nous utiliserons 14 rats par condition expérimentale avec un total de 56 animaux. Ce nombre réduit reste suffisant pour obtenir une réponse statistique significative.

Raffiner : Toutes les procédures sont optimisées pour soulager le stress et la douleur des animaux tout le long de l'étude. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale gazeuse avec une couverture analgésique et une anesthésie locale. La température corporelle des animaux est maintenue grâce à un tapis chauffant pendant les chirurgies. Une mise en place de nursing s'effectue après les chirurgies en mettant à disposition de la nourriture posée dans la cage afin de faciliter l'accès à l'aliment. Un traitement peut être administré en fonction de la cicatrisation de la plaie (solution désinfectante, analgésique). Pour leur bien-être, limiter leur stress et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire.

12905 Récemment, le fardeau mondial du paludisme a diminué grâce à différents programmes de prévention et de lutte contre les vecteurs. Toutefois, en 2017, près de 219 millions de personnes ont été infectées et le nombre de décès dus au paludisme a été estimé à 435 000. A l'heure actuelle, aucun vaccin n'est disponible contre les différents agents causals du paludisme et, en dehors de la lutte contre les vecteurs, sa prévention et son traitement reposent principalement sur les médicaments antipaludiques. Or, l'apparition de résistances à l'artémisinine et ses dérivés (derniers antipaludiques mis sur le marché et recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé) ayant été observée, la recherche portant sur le développement de nouvelles molécules antipaludiques demeure indispensable.

Dans cette optique, plusieurs dérivés de la famille de molécules des aminopyridine-méthanolés (APM) ont été synthétisés. L'évaluation *in vitro* de leurs activités antipaludiques, cytotoxicité, mutagénicité et propriétés pharmacocinétiques a ensuite été entreprise. Les souris Balb/c ByJ sont utilisées ici dans le but de tester *in vivo* la toxicité aiguë des douze composés jugés les plus

intéressants au regard de leur potentiel thérapeutique : bon index thérapeutique (rapport activité antipaludique/toxicité) et propriétés pharmacocinétiques intéressantes.

Les protocoles expérimentaux présentés dans le projet ont été construits en respectant la règle des 3R.

Remplacer : Si les étapes préalables *in vitro* nous permettent de présélectionner les molécules d'intérêt et donc de minimiser le nombre d'animaux à utiliser, il n'est pas actuellement possible de se passer d'une évaluation de la toxicité aiguë des molécules sur un organisme entier. Cette étude nous permettra de déterminer les produits et doses compatibles à une administration lors de la future évaluation *in vivo* de l'activité antipaludique dans ce même modèle murin (Balb/c ByJ) d'infection à *Plasmodium berghei* ANKA (souche murine de paludisme pour les rongeurs) pour lequel les 4 molécules ayant les profils les plus intéressants dans l'étude de toxicité aiguë seront retenues. La stratégie de remplacement n'est pas possible à cette étape du projet, les différentes études *in vitro* ayant été menées préalablement avec des résultats intéressants et concluants. A ce stade, le recours à l'expérimentation animale est essentiel pour confirmer ces premiers résultats. En effet, le remplacement par une méthode alternative n'est pas viable et l'efficacité des anti-infectieux est liée à leurs propriétés pharmacodynamiques/pharmacocinétiques. Les modèles murins et primates sont les plus pertinents pour l'étude des activités antipaludiques. Dans le cadre du développement des molécules testées ici, il est prévu d'évaluer l'activité antipaludique *in vivo* sur le modèle murin BALB/c ByJ, pour lequel la physiopathologie pour le paludisme généré par la souche de *Plasmodium berghei* ANKA est bien décrite. Il est donc logique de tester la toxicité aiguë des composés sur cette même lignée de souris avant de lancer une expérimentation de plus grande envergure sur le modèle infecté.

Réduire : Une réduction du nombre d'animaux utilisés a été privilégiée en ne considérant que l'effectif absolument nécessaire pour évaluer la toxicité aiguë tel que décrit dans la directive OCDE 420 et en adoptant une approche séquentielle des procédures pour l'obtention des informations sur la toxicité aiguë des molécules. Ainsi, le nombre de souris nécessaire à cette étape d'évaluation de la toxicité aiguë a été évalué à 132 femelles matures. Les femelles ont été retenues, car, lorsqu'une différence de sensibilité entre les deux sexes est décrite dans les études de toxicité, ce sont les femelles qui présentent la sensibilité la plus élevée (OCDE 420).

Raffiner : Une étude préliminaire sera effectuée en injectant par voie intrapéritonéale une dose prédéterminée par la directive de l'OCDE 420 et unique de produit à une seule souris. Celle-ci sera observée pendant 14 jours à la recherche de signes de toxicité. Des points limites adaptés ont été définis (perte de poids importante, signes de souffrance) et seront relevés dans une grille d'évaluation lors du suivi au minimum quotidien des animaux.

Le résultat obtenu permettra d'emblée d'éliminer les doses létales de produits et de n'effectuer l'étude principale de toxicité aiguë sur 4 animaux supplémentaires que pour des doses n'ayant engendré que des effets adverses modérés, comme recommandé par la directive OCDE 420. Les propriétés statistiques de la procédure décrite par la directive OCDE 420 et utilisée dans ce projet ont été évaluées via des modèles mathématiques dans une série d'études.

Le souci de raffinement se manifeste par la priorisation des procédures prévues, une étude préliminaire sur un seul animal permettant de choisir une dose non létale à appliquer à un plus grand nombre d'animaux dans l'étude principale pour éviter des souffrances inutiles. De plus, tout au long de l'expérimentation, la vie en groupe sera privilégiée. Une attention particulière sera portée à l'enrichissement de l'environnement des rongeurs, par la mise en place d'abris et d'éléments à ronger, de manière à limiter l'anxiété des animaux. En dehors de la période précédant l'injection, les souris auront accès ad libitum à la nourriture et à la boisson. L'atteinte des points limites définis précédemment entrainera l'euthanasie compassionnelle des animaux. Pour ne pas masquer les signes de toxicité aiguë des molécules, l'administration d'analgésique n'est pas envisageable dans le cadre de cette étude.

12906 Les leucémies sont des cancers qui touchent les cellules précurseurs des cellules du sang. De nombreuses mutations (le plus souvent acquises) en sont à l'origine. La biologie moléculaire a

permis d'identifier des anomalies génétiques très rares, qui peuvent être responsables de formes de leucémie très agressives et résistantes aux traitements conventionnels. Ces anomalies sont communes à d'autres pathologies sanguines qui sont traitées avec des molécules spécifiques. Notre projet vise à tester la possibilité de l'utilisation de ces molécules dans le traitement des leucémies résistantes.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le recours à l'animal est indispensable car il n'est pas possible de suivre les effets d'un médicament dans un organisme vivant *in vitro*. Le choix de l'animal s'est porté sur la souris à qui l'on peut greffer des cellules leucémiques humaines et qui constitue actuellement le modèle le plus proche des leucémies humaines. Dans notre étude, des souris seront greffées avec les cellules leucémiques de 3 patients et l'efficacité thérapeutique de plusieurs molécules d'intérêt thérapeutique, utilisées seules ou en association, sera testée. Ces tests sont basés sur des protocoles développés précédemment par une équipe de collaborateurs.

Réduire : Pour chacune des expériences de souris greffées avec les cellules leucémiques de chacun des 3 donneurs, 4 conditions seront testées (aucun traitement/contrôle, chacune des molécules d'intérêt seules ou en combinaison). Au total, nous utiliserons 180 souris immunodéficientes, qui acceptent la greffe de cellules humaines, nombre suffisant pour un traitement statistique des données et pouvoir affiner le traitement donné aux souris développant la leucémie. La totalité du projet sera menée sur trois ans.

Raffiner : Pour chaque expérience, des prélèvements de sang et de moelle osseuse seront réalisés pour évaluer l'évolution de la leucémie après traitement. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance animale et l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Des critères d'arrêt précis sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Un milieu enrichi (tubes en carton et nids en coton, coupelles d'aliment enrichi et semi-solide) est utilisé dans les cages de ces expériences pour pallier à la longueur et à la sévérité des procédures.

12907 La hernie de coupole diaphragmatique (HDC) est une malformation congénitale rare affectant 1 /3000 naissances vivantes et correspond à une anomalie de développement du diaphragme avec ascension des viscères abdominaux dans le thorax. Cette malformation induit des anomalies de développement pulmonaire et vasculaire associées à un échec de l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance qui se complique souvent d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) responsable d'une mortalité périnatale dans 30 % des cas. Cette malformation est diagnostiquée en période anténatale dans plus de 60 % des cas et le dépistage d'une forme sévère de HDC implique la question sur la possibilité d'une intervention prénatale et/ou périnatale pour l'évolution naturelle. Le sildénafil induit une vasodilatation pulmonaire et améliore la formation des vaisseaux pulmonaires, et éviterait les lésions de remodelage vasculaire. Son efficacité a été démontrée dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) chez l'adulte et a été utilisé en seconde intention dans l'HTAP persistante du nouveau-né. Les acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI ω -3) possèdent des propriétés vasodilatatrices démontrées mais pourraient également présenter des effets sur le développement pulmonaire et vasculaire. Les buts de cette recherche sont 1) d'étudier les effets de l'administration maternelle d'agents vasodilatateurs sur le développement pulmonaire chez le fœtus de brebis porteur de HDC et 2) d'évaluer l'effet d'un clampage retardé du cordon ombilical chez ces fœtus porteurs de HDC sur l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance. La tolérance des traitements vasodilatateurs (Sildenafil ou AGPI ω -3) chez la mère et chez l'agneau sera étudiée chez 24 brebis gestantes. Quarante-seize brebis gestantes ainsi que leur 96 fœtus seront opérés pour la création du modèle de hernie de coupole puis dans un second temps pour mettre en place des outils de mesure chez le fœtus (cathéters et sonde de débitmétrie) afin d'étudier les effets sur la circulation pulmonaire fœtale de l'administration maternelle d'agents vasodilatateurs chez la brebis ainsi que les effets sur l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance. En fin de protocole, les agneaux seront euthanasiés et les poumons prélevés pour une étude histologique. Les résultats de ce projet de recherche vont permettre d'identifier de nouveaux traitements potentiels anténataux de fœtus porteurs de HDC avant la mise en œuvre d'essais thérapeutiques chez l'homme.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : La recherche en thérapie fœtale ne permet pas de remplacer les étapes expérimentales chez l'animal avant la mise en œuvre d'essais thérapeutiques chez l'homme, il n'y a donc pas de mesures de remplacement possible dans le cadre de ce projet de recherche.

Réduire : Les mesures visant réduire le nombre d'animaux inclus dans cette recherche sont la possibilité dès que possible de combiner l'étude sur la circulation pulmonaire fœtale avec celle de la transition à la naissance.

Raffiner : Les mesures de raffinement prévues sont l'hébergement en box individuel avec litière, la présence d'un personnel dédié aux soins des animaux et à l'entretien des locaux. Les brebis gestantes pourront boire et manger à volonté.

12908 L'utilisation massive de produits phytosanitaires est fréquemment évoquée comme un facteur majeur de la dégradation rapide de la biodiversité. Ces produits ont été créés pour perturber des systèmes biologiques causant la mort des cibles organiques. Cependant, la plupart des travaux portant sur les effets des pesticides se sont focalisés sur la toxicité immédiate (effets létaux) à doses relativement hautes et en utilisant des modèles de laboratoire. Pourtant, de faibles doses présentes dans l'environnement peuvent, à travers leurs effets sub-létaux, modifier profondément la physiologie, la reproduction et la survie des organismes non cibles.

Le projet consiste à examiner le développement d'œufs et de têtards de crapaud épineux (*Bufo spinosus*) dans de l'eau présentant des concentrations de deux contaminants d'origine phytosanitaires, le Tebuconazole (fongicide) et le Nicosulfuron (herbicide) en testant des concentrations retrouvées dans l'environnement dans un contexte de contamination chronique.

La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante :

Le Remplacement n'est pas possible car le suivi cible spécifiquement l'espèce en question.

La Réduction a été prise en compte en limitant au minimum le nombre d'animaux employés. En effet, l'expérience sera menée dans un premier temps sur 1500 œufs (jusqu'à l'éclosion) issus de 10 pontes alors qu'une femelle adulte pond en général entre 5000 et 7000 œufs par ponte. Dans un deuxième temps, 260 têtards (issus de la première phase de l'expérience) seront suivis jusqu'à la métamorphose.

Enfin, le Raffinement comprendra le maintien des animaux dans des conditions très proche du milieu naturel et l'utilisation de points limites adaptés (en cas d'observation de comportement anormal pendant plus de 2 jours (apathie, immobilité continue, absence d'alimentation), les têtards seront retirés de l'expérience et placés en conditions normales (sans contaminants).

12909 Le rôle du système immunitaire est primordial dans la répression de la croissance tumorale. Bien que l'immunothérapie ait montré son succès, elle se heurte à l'action pro-tumorale de deux acteurs majeurs et complémentaires: les lymphocytes T régulateurs (Treg) et le Transforming Growth (TGF)-bêta. Les Treg favorisent la croissance tumorale en réprimant l'action des autres acteurs du système immunitaire. Le TGF-bêta, cytokine hautement conservée chez les mammifères, favorise de façon directe la croissance des cellules tumorales, et réprime également l'activation anti-tumorale du système immunitaire.

Le TGF-bêta est produit sous une forme inactive, et passe sous sa forme active notamment par l'action de l'intégrine (Itg)av β 8 (Itg β 8), fortement exprimée par les Treg contrairement aux autres lymphocytes T.

L'activation du TGF-bêta, par l'Itg β 8 exprimée par les Treg, est un frein à l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Afin de comprendre la biologie des Tregs Itg β 8+, l'objectif de ce projet se divise en trois parties :

1) Connaître l'origine des Treg Itg β 8+ (périphérique et/ou thymique) qui permettra de les caractériser pour pouvoir envisager un ciblage spécifique par immunothérapie.

2) Comprendre si l'absence de l'Itg β 8 dans les Treg est associée ou non à un mauvais pronostic dans les tumeurs et savoir si son absence favorise l'efficacité thérapeutique de l'anti-PD1.

3) Connaître la source du TGF- β activé par les Treg Itg β 8+, qui nous permettra de comprendre la dynamique de la réponse immunitaire anti-tumorale entre les cellules productrices du TGF- β et les Treg Itg β 8+.

Ce projet implique une analyse à l'échelle de l'organisme entier. Les perspectives offertes par ce projet sont riches tant au niveau de la recherche fondamentale, décrivant les mécanismes reliant le TGF- β et les Treg via l'Itg β 8 dans la croissance tumorale, qu'au niveau de la recherche appliquée en ouvrant la voie vers l'utilisation de neutralisants de l'Itg β 8 en thérapies anti-cancéreuses.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Seule la souris, mammifère de petite taille, dont le système immunitaire est très bien caractérisé et proche de celui de l'Homme, et pour lequel des lignées cancéreuses existent, permettra de répondre aux questions biologiques posées dans des conditions physiopathologiques adéquates.

Réduire : Des groupes de 3 à 8 animaux adultes, d'âge et de sexes similaires, par expériences, seront réalisés. Le nombre d'animaux sera réduit à son strict minimum, en veillant à une interprétation statistique correcte des résultats. Pour ce projet, 575 souris seront impliquées sur une durée totale de 5 ans (96 pour le maintien de lignées et 458 pour l'expérimentation).

Raffiner : L'observation des animaux sera réalisée tous les jours par les expérimentateurs et permettra un suivi précis des points limites et de limiter toute souffrance animale. Aucun animal ne sera isolé et le milieu des cages ventilées sera enrichi selon les règles de l'établissement hébergeur. Des points limites précoces permettront d'éviter tout signe de douleur ou de stress majeurs.

12910 Les stimuli sensoriels externes (auditifs, visuels ...) sont des informations transformées par les organes sensoriels (cochlée [oreille], rétine ...) en influx nerveux. C'est sous cette forme qu'ils parviennent au cerveau, où ils vont être traités par des zones dites sensorielles primaires. Ce premier niveau de traitement de l'information sensorielle est suivi immédiatement par d'autres niveaux d'analyse, d'interprétation et d'intégration des informations qui arrivent au cerveau. Ces autres niveaux de traitement de l'information neuronale font également appel à d'autres fonctions du cerveau tels que l'attention, la mémoire, l'apprentissage. Le mécanisme neuronal mis en œuvre par le cerveau pour l'encodage de ces fonctions cognitives reste mal connu. Il représente un défi majeur en neurosciences car il en va de notre perception du monde extérieur. De plus, la comparaison de ce mécanisme neuronal de la cognition chez le primate non humain et chez l'Homme permettra de mieux comprendre l'unicité du cerveau humain. Ce projet s'inscrit dans la suite de travaux réalisés par notre équipe sur les mécanismes de l'encodage neuronal de la conscience et des séquences abstraites. L'activité neuronale sera mesurée par les moyens de l'imagerie cérébrale par IRM fonctionnelle (IRMf, mesurant indirectement l'activité cérébrale en mesurant), par électroencéphalographie (EEG, mesurant directement l'activité électrique cérébrale) et par la neurophysiologie (enregistrement intracrânien, mesurant directement l'activité électrique neuronale unitaire ou des champs locaux). L'étude de l'activité cérébrale sera réalisée à l'état éveillé ainsi que sous anesthésie générale afin de déterminer le rôle de la conscience dans le traitement cérébral de l'information sensorielle. Le projet cherchera à comparer l'activité cérébrale obtenue chez le primate non humain avec celle obtenue chez l'Homme et menée en parallèle dans le cadre d'études cliniques.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le travail a pour objectif d'élucider les mécanismes cérébraux de la perception auditive et visuelle (séquences de stimuli visuels et/ou auditifs) chez le modèle primate non humain conscient et après suppression de la conscience par anesthésie générale. Celui-ci présente des similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'Homme, et la taille de son cerveau est compatible avec l'utilisation des équipements requis (IRM, respirateur, etc.) et la complexité des stimuli sensoriels proposés. C'est également le modèle le plus utilisé en neuroscience, ce qui permettra des comparaisons avec d'autres études dans le monde.

Réduire : Ce projet implique 8 animaux, tous issus d'un élevage autorisé et dédié à des études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

Raffiner : L'état de santé des animaux sera contrôlé de manière régulière avec une attention particulière au bien-être animal. Les méthodes expérimentales proposées ne présentent aucun danger pour l'animal grâce à des critères drastiques d'arrêt en cas de signes de souffrance qui ont été préalablement déterminés. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par un vétérinaire avant d'être réalisés par un médecin hospitalier spécialement formé. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis continuellement pendant les examens.

12911 De nombreuses études scientifiques ont constaté le déclin de la population de Moineau domestique en Europe au cours des dernières décennies. Plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer ce phénomène (prédation, manque de sites de ponte, pollution, maladie, etc.). Récemment, il a également été suggéré qu'une baisse d'investissement parental (par exemple lors de la désertion du nid par un membre du couple) pouvait être énergétiquement contraignante pour un poussin en cours de développement, engendrant la production d'individus de moindre qualité non recrutés dans la population. Toutefois, l'influence de ces conditions de développement sur des composantes liées à la valeur sélective individuelle a rarement été étudiée. Nous souhaitons donc tester expérimentalement l'effet du retrait d'un parent sur la morphologie, la physiologie et la survie de poussins de Moineau domestique. Nous allons pour cela retirer durant 48 heures le mâle de la moitié des couples captifs qui constituent notre échantillon (N = 21 couples), lorsque les poussins seront âgés de 7 jours. Nous effectuerons alors un suivi régulier de la croissance des poussins (N = 63 en se basant sur une moyenne de 3 poussins par couple) grâce à des relevés morphologiques (bec, aile, tarse, masse corporelle). L'effet sur la physiologie des poussins, élément novateur de ce projet comparativement aux protocoles expérimentaux similaires déjà réalisés chez cette espèce, sera évaluée grâce à trois prélèvements sanguins et deux mesures métaboliques en chambres calorimétriques réalisés entre le 7ème et le 90ème jour après éclosion. Grâce à cette approche expérimentale, ce projet scientifique tend à mieux comprendre 1) les conséquences à court terme de conditions de développement contrastées sur le développement des poussins de Moineau domestique (croissance morphologique, condition corporelle, mécanismes hormonaux, longueur des télomères) ; 2) les effets à long terme de conditions de développement contrastées sur la survie des juvéniles et la vitesse de raccourcissement des télomères (un proxy de la longévité). Au maximum, la taille d'échantillon pour cette étude sera de 105 individus.

La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante :

Le Remplacement n'est pas possible car les expériences ciblent spécifiquement cette espèce.

La Réduction a été prise en compte en limitant au minimum le nombre d'animaux employés. Egalement, les prélèvements sanguins ainsi que les mesures morphologiques et métaboliques seront réalisés en nombre limité tout en permettant des analyses statistiques robustes. L'impact de l'expérience est très limité (prélèvements sanguins et mesures du métabolisme basal) et les animaux retrouveront leurs conditions de captivité.

Le Raffinement comprendra l'enrichissement des volières et cages individuelles utilisées ainsi que le retrait du mâle durant une durée limitée (point limite préalablement défini par des expériences sur le même modèle d'étude).

12912 Une approche innovante dans le développement de traitements anti-cancers consiste à utiliser des anticorps monoclonaux (Acm) thérapeutiques dirigés contre des antigènes de surface exprimés plus particulièrement par les cellules tumorales. Pour ce faire, deux conditions doivent être remplies. La première est d'identifier l'antigène tumoral correspondant et la seconde de développer des Acm spécifiques capables de reconnaître et de se fixer à l'antigène. Ces approches sont de deux types, l'Acm peut être efficace par lui-même ou seulement après couplage à une drogue ou une toxine. Notre laboratoire a identifié et va identifier de nouvelles cibles antigéniques potentielles et souhaite développer des anticorps contre ces cibles. Il est indispensable d'avoir recours à des injections par

voie intrapéritonéale avec l'antigène recombinant produit par le laboratoire (immunisation) et ensuite, après obtention des Acm *in vitro*, d'obtenir des quantités suffisantes d'Acm pour réaliser des tests fonctionnels (développement de liquide d'ascite). A ce jour, il y a 5 antigènes à l'étude. La règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux, de raffiner la méthodologie utilisée et de remplacer les animaux par d'autres approches sera complètement considérée et appliquée pour la mise en place du projet. La condition d'hébergement des animaux recevra une attention toute particulière comme décrit dans la demande.

Remplacer : A chaque fois que cela sera possible, des modèles *in vitro* seront développés. Nous limiterons l'utilisation des animaux aux seules expériences considérées comme absolument indispensables afin d'utiliser le moins d'animaux possibles.

Réduire : Sur une période de 5 ans, sur la base de nos études précédentes, nous utiliserons un nombre minimum mais nécessaire de souris estimé entre 90 et 150.

Raffiner: Les injections et les prélèvements seront réalisés en utilisant des protocoles permettant de minimiser l'inconfort subi par les animaux (acclimatation, temps de récupération, utilisation d'analgésique). La mise en place de points limites permettra d'éviter la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris. L'hébergement des animaux se fera en confinement adapté en cages individuellement ventilées à raison de 4 souris par cage. La nourriture et l'eau seront fournies ad libitum. L'environnement sera enrichi par ajout de coton et de copeaux compressés utiles à la nidification. Dans le souci du respect du bien-être animal, les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne permettant de s'assurer des conditions adéquates de stabulation et de l'état de santé des animaux.

12913 L'objectif de ce travail est d'étudier séquentiellement chez la souris les modifications du microbiote intestinal consécutives à l'infection par *Cryptosporidium parvum*. La cryptosporidiose est une infection intestinale causée par des parasites pathogènes du genre *Cryptosporidium*. Chez l'Homme, *Cryptosporidium* spp. est la première cause de diarrhée sévère d'origine parasitaire. Elle peut engager le pronostic vital chez les sujets atteints d'un déficit de l'immunité à médiation cellulaire (SIDA, cancers, transplantés). Les mécanismes physiopathologiques de l'infection par *Cryptosporidium* spp. ne sont pas encore entièrement élucidés et l'arsenal thérapeutique contre la cryptosporidiose demeure limité, la plupart des molécules antiparasitaires étant inactives.

La cryptosporidiose humaine peut entraîner à terme des conséquences notables (troubles de la croissance, et des fonctions cognitives) chez les très jeunes enfants et les enfants malnutris vivant en zone d'endémie. Elle peut aussi être à l'origine de manifestations du type de celles observées au cours du syndrome de l'intestin irritable (SII).

Le microbiote intestinal est un écosystème très diversifié, complexe et spécifique de chaque individu. Des données récentes suggèrent que chez la souris, les microbiotes individuels sont répartis en trois groupes ou « entérotypes » selon la signature bactérienne avec respectivement prépondérance des bactéries du groupe Bactéroïdes, Prevotella et Clostridiales. Au cours de certaines infections y compris parasitaires (exemple la giardiose), le microbiote est déséquilibré et présente une composition modifiée avec perte de diversité. Bien que les causes du SII demeurent méconnues à ce jour, certains travaux suggèrent que cette dysbiose du microbiote intestinal peut jouer un rôle important dans son développement. La connaissance des modifications de la composition du microbiote intestinal avant, pendant et après infection parasitaire permettra d'envisager l'indication de transplantations de microbiote fécal (introduction digestive de fèces de donneur sain) en vue de rééquilibrer la flore intestinale altérée de l'hôte infecté, et de limiter l'évolution vers des pathologies associées à la dysbiose.

Une étude des effets d'une infection parasitaire sur le microbiote intestinal n'étant réalisable qu'*in vivo*, un modèle de souriceaux nouveau-nés validé de longue date et précédemment utilisé dans notre laboratoire a été choisi. La connaissance approfondie de la biologie murine justifie le choix d'un modèle souri, et la sensibilité temporaire à l'infection cryptosporidienne des souriceaux immunocompétents, c'est-à-dire dont les réponses immunitaires sont conservées, permet d'éviter l'utilisation d'immunosuppresseurs qui serait requise chez des souris plus âgées pour obtenir une

infection parasitaire durable (ou l'utilisation d'animaux génétiquement immunodéficients). Il est notable que chez le souriceau, l'infection n'entraîne pas à court terme d'effet clinique qui serait dommageable pour les animaux (en particulier, absence de diarrhée et d'atteinte de l'état général).

Cette étude est entièrement soumise à la "règle des 3R" :

Remplacer : Il n'existe pas d'alternative *in vitro* à l'utilisation d'animaux pour étudier l'évolution du microbiote intestinal au cours d'une infection parasitaire.

Réduire : Le nombre d'animaux prévu (au total 66 souris dont 60 souriceaux non-sevrés sous 6 mères) est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet ;

Raffiner : La notion de raffinement est prise en compte à travers les conditions d'élevage en animalerie universitaire et d'expérimentation qui seront optimisées (hébergement en groupe, nids, enrichissement) et assureront le bien-être des animaux et la validité des résultats tout au long des procédures expérimentales.

12914 Les affections ostéoarticulaires chroniques ou rhumatismales sont la première cause de morbidité au monde en touchant environ 20% de la population et tout particulièrement les adultes de plus de 50 ans. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité. Les deux maladies rhumatismales les plus fréquentes sont l'arthrose ou ostéoarthrite et l'arthrite rhumatoïde.

L'arthrite rhumatoïde est une maladie chronique auto-immune caractérisée par des poussées inflammatoires touchant de façon progressive de nouvelles articulations. Ces poussées inflammatoires sont associées à une invasion leucocytaire de la synoviale, à des destructions osseuses et cartilagineuses ainsi qu'à un remodelage articulaire anarchique.

Les traitements des maladies rhumatismales sont basés principalement sur le soulagement de la douleur intense et de l'inflammation : traitements antalgiques et analgésiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens ou anti-inflammatoire de type corticoïdes, immunosuppresseurs. Si l'inflammation peut être contrôlée chez certains patients, il n'existe malheureusement à ce jour, aucun traitement permettant de guérir la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. Cela s'explique par une variabilité des manifestations cliniques entre chaque patient. La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre les rhumatismes chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale.

Les modèles d'arthrite réalisés chez le rongeur (rats et souris) offrent des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique. Le modèle de mono-arthrite induit par injection d'antigène étranger (albumine sérique bovine méthylée, intitulée mBSA) offre d'une part la possibilité de se rapprocher de l'étiologie de la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde tout en minimisant les souffrances induites à l'animal par rapport à un modèle de polyarthrite ; d'autre part il permet également de modéliser l'inflammation d'une articulation liée à des infections.

Le but de ce projet est donc de mettre au point un modèle de mono-arthrite induite par injection d'antigène étranger chez le rat, selon les modèles décrits dans la littérature (procédure n°1), puis d'évaluer l'efficacité de différents principes actifs administrés par voie parentérale ou orale (procédure n°2). Notre société étant une CRO qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique, le deuxième objectif est d'évaluer de nouveaux composés créés et développés par nos clients pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse. Cette deuxième procédure est une procédure générique étant donné que nous ne connaissons pas à l'avance les différents composés qui seront à tester.

Procédure 1: Optimisation du modèle de mono-arthrite chez le rat, basée sur ce qui est décrit dans la littérature. Le but étant de valider le modèle le plus proche de la pathologie humaine et de définir des composés de références appliqués en clinique. Nous évaluerons l'efficacité des différentes

molécules de référence (anti-inflammatoires, immunosuppresseurs, ...). La procédure 1 comptera 120 rats.

Procédure 2 : Une fois, le modèle validé, différents candidats médicaments en comparaison à un produit de référence adapté seront étudiés et appliqués selon les schémas thérapeutiques inhérents aux candidats médicaments, dans le cadre d'études menées au sein de la société. Un maximum de 100 animaux par étude sera considéré en prenant en compte la capacité d'hébergement et de gestion des animaux par notre équipe. Nous estimons réaliser 3 études par an, sur 5 ans. Ainsi, la procédure 2 comptera 1500 animaux.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour :

Remplacer : l'arthrite étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Toutefois, les principes actifs seront préalablement testés *in vitro* afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs.

Réduire : pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes.

Raffiner : les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Pour cela, la réalisation des injections d'antigène et des traitements analgésiques sera réalisée par des expérimentateurs formés permet de réduire le traumatisme et le stress induit. Outre la gestion de l'analgésie et de la procédure anti-inflammatoire, l'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un porteur du projet pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière sera plus spécifiquement axée sur les douleurs généralement occasionnées par les rhumatismes et sur le poids de l'animal (indice majeur de stress et de souffrance) et permettra l'ajustement des traitements analgésiques, par ailleurs indispensables dans ce modèle. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

12915 Les grandes pertes de substances osseuses représentent un challenge thérapeutique pour les chirurgiens orthopédistes. Les approches thérapeutiques sont souvent longues et contraignantes pour le patient, représentant un enjeu médical et socio-économique majeur. Une de ces solutions thérapeutiques offrant de bons résultats, est la technique de reconstruction osseuse développée par Masquelet. Elle consiste en la reconstruction d'une perte de substance osseuse importante grâce à un protocole en deux temps opératoires. Le premier temps opératoire conduit à la formation progressive d'une membrane biologique, appelée membrane induite, capable lors d'un second temps opératoire de régénérer la partie retirée du squelette après interposition de greffons osseux. Nous étudions ce phénomène depuis quelques années dans notre unité de recherche. Travaillant en parallèle de cela sur la calcification des vaisseaux et compte tenu des similitudes anatomiques existant entre l'aorte et la membrane induite, nous souhaitons évaluer la capacité du vaisseau à remplacer la membrane induite dans un modèle de régénération de grande perte osseuse. Des études précédentes réalisées chez le lapin puis chez l'homme, ont montré de bons résultats dans le remplacement de la trachée par une allogreffe d'aorte. Lors du temps chirurgical, la reconstruction osseuse sera faite après une résection osseuse d'une partie du fémur, qui sera reconstruite avec de l'aorte mise autour du fémur et de la greffe osseuse.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Etant donné, l'impossibilité de réaliser ce type d'étude dans un modèle invertébré et l'impossibilité de modélisation ou de validation du modèle par des études *in vitro*, notre équipe de recherche a développé un modèle murin rendant possible l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la prise en charge de grande perte de substance osseuse par la technique de Masquelet.

Réduire : Au total, 50 rats seront utilisés pour la génération du modèle de reconstruction osseuse par aorte dont 10 témoins et 20 issus de nécropsies. La taille de chaque groupe (10 animaux) a été réduite au maximum pour obtenir suffisamment de résultats exploitables tout en évaluant sur les mêmes animaux un grand nombre de paramètres, tels que l'organisation architecturale des aortes ossifiées, la présence de zone de minéralisation, l'activité des précurseurs osseux.

Raffiner : Au cours de cette étude, toute souffrance susceptible d'apparaître sera traitée par l'utilisation d'analgésiques adaptés durant l'intervention et en post-opératoire. Des points limites ont été établis. Les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical, tube en carton offrant une cache) pour favoriser le bien-être des animaux.

12916 L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est un outil puissant pour observer le cerveau. L'IRM joue donc un rôle central dans les hôpitaux comme dans les centres de recherche. Toutefois, l'IRM conserve un potentiel technique inexploré. Un des principaux objectifs de ce projet est de développer une nouvelle méthode d'imagerie, l'IRM fonctionnelle couplée à l'optogénétique. L'optogénétique est un ensemble de techniques permettant l'étude fonctionnelle par voie optique de populations, compartiments ou processus cellulaires ciblés génétiquement. En neurosciences, l'optogénétique permet d'observer et de contrôler en temps réel l'activité de populations neuronales spécifiques par simple illumination du tissu nerveux. L'optogénétique peut être couplée à l'IRM fonctionnelle apportant un degré de sophistication inédit aux méthodes expérimentales employées en neurosciences fondamentales afin d'analyser les circuits neuronaux. De nombreuses maladies psychiatriques et neurologiques sont associées à des défauts de connectivités cérébrales. Pouvoir identifier et caractériser ces défauts est essentiel dans la compréhension de ces pathologies et dans leur prise en charge. Notre second objectif est de caractériser ces défauts de connectivité cérébrale par ces techniques d'IRM dans plusieurs modèles de souris pour ces maladies du cerveau. Notre étude utilisera différentes souches de souris modélisant la schizophrénie, la dépression, la maladie de Huntington ou encore la maladie d'Alzheimer.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Réduire : Le nombre d'animaux a été déterminé de manière à ce que les résultats puissent être statistiquement représentatifs pour chaque expérience tout en permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Dans ce projet de 5 ans, nous prévoyons d'utiliser 783 souris.

Raffiner : Les interventions chirurgicales et les acquisitions IRM s'effectuent sous anesthésie générale. La température corporelle des souris est maintenue à 36,5°C soit par l'utilisation d'une couverture chauffante dans le cas d'une chirurgie, soit par l'utilisation d'un berceau chauffant dans le cas de l'IRM. Durant l'acquisition IRM, la profondeur de l'anesthésie est surveillée par la mesure du rythme respiratoire, ce qui nous permet d'ajuster notre anesthésie dès le moindre signe de réveil. Après la chirurgie ou l'IRM, les souris sont placées dans une cage de réveil thermo-réglée et un traitement pharmacologique de confort (anti-inflammatoire) sera appliqué dans le cas d'une chirurgie.

12917 Pour le traitement des douleurs aiguës (post-traumatiques, post-opératoires), les analgésiques opioïdes sont souvent utilisés. Cependant, leur utilisation est fortement remise en cause de nos jours par rapport aux effets indésirables que ceux-ci peuvent engendrer, notamment des phénomènes d'accoutumance et de dépendance qui peuvent aboutir à des overdoses. Ainsi, en France, le nombre d'overdose suite à l'utilisation abusive d'antidouleurs opioïdes a augmenté de 146% entre 2000 et 2015, avec plus de quatre décès par semaine. Le phénomène est encore plus important dans d'autres pays comme les Etats-Unis où ce chiffre a atteint 72 000 décès en 2017. Ainsi, le développement de nouveaux médicaments pouvant traiter les douleurs aiguës est donc très important et s'avère d'une utilité publique majeure. Dans ce but, nous allons tester 4 nouveaux composés pharmaceutiques dans une étude préclinique de manière à valider leur efficacité. Les phases d'études in-vitro ont déjà été effectuées et des études pharmacocinétiques de ces

substances ont déjà été réalisées pour des doses supérieures ou équivalentes à celles que nous utiliserons, sans effets secondaires visibles. L'utilisation d'animaux est donc nécessaire pour appréhender leur effet analgésique dans un contexte physiologique.

Afin de tester ces 4 composés, un modèle de douleur post-opératoire admis par la communauté scientifique sera utilisé (modèle de Brennan). Ce modèle consiste en une légère incision au niveau de la patte arrière de l'animal, suivi d'une suture de la plaie. Ce modèle permet d'appréhender deux modalités sensorielles majeures qui sont retrouvées dans les douleurs aiguës : une hypersensibilité au toucher et à la température. Ces deux modalités étant détectées par des types de neurones sensoriels différents et les voies neuronales permettant la transmission au niveau central de ces influx étant différentes, il est important de vérifier l'effet analgésique des composés sur ces deux composantes sensorielles. Ainsi pour chacun des composés, nous utiliserons 50 animaux répartis en 5 groupes : un contrôle qui sera traité avec la solution véhicule, un contrôle positif (Prégabaline : analgésique couramment utilisé dans les études précliniques), et trois groupes traités avec 3 doses différentes du composé à tester.

En parallèle, afin de vérifier les propriétés pharmacocinétiques des composés dans un état pathologique, 12 animaux supplémentaires (4 pour chaque dose) seront utilisés afin d'effectuer un prélèvement sanguin. Ainsi pour les 4 composés, nous aurons ainsi besoin de 248 souris.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer: Les différents composés ont déjà été testés pour leur activité sur des modèles in-vitro. L'utilisation d'animaux est maintenant nécessaire pour appréhender leur potentiel effet analgésique sur des modèles de douleur dans son contexte physiologique.

Réduire : L'utilisation du logiciel Sigma Plot nous permet d'estimer au mieux le nombre d'animaux nécessaire avec une différence significative ($p < 0.05$) pour une puissance de 80-90% pour l'ANOVA : soit 10 animaux par groupes. La sensibilité mécanique et thermique des animaux pourra être testée sur les mêmes animaux à un jour d'intervalle (D+1 et D+2 post-chirurgie).

Raffiner : Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter naturellement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant l'enrichissement du milieu. Nous utilisons alternativement des carrés de ouates pour que les animaux puissent faire un nid, des petits morceaux de bois ou des dômes en cellulose, qui sont changés chaque semaine. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et des personnels formés et compétents sont dédiés à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état de santé et environnemental des animaux est contrôlé. D'autre part, bien que des analgésiques ne pourront être utilisés lors des tests (à juste titre, nous voulons valider l'effet analgésique de ce nouvel inhibiteur sur les modèles de douleurs neuropathiques), le recours aux analgésiques est prévu dans le cas où le niveau de douleur/souffrance serait important.

12918 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, chronique et progressive. Elle présente à 5 ans après le diagnostic un taux de mortalité supérieur à 70% et il n'existe pas de thérapie efficace. La FPI est essentiellement caractérisée par une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et de fibroblastes dans les espaces aériens distaux aboutissant à une insuffisance respiratoire. Les fibroblastes accumulés dans les foyers fibroblastiques sont les principaux acteurs de cette accumulation de MEC. Lors de la FPI, il se met en place un mécanisme de réparation anormal au cours duquel on assiste à une réactivation de phénomènes impliqués dans le développement embryonnaire. PRRX1 (Paired Related Homeobox protein-1) est un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire, en particulier au cours de la morphogenèse crânio-faciale et de la squelettogenèse.

Notre hypothèse est qu'il existe une perturbation de l'expression de PRRX1 dans le poumon au cours de la fibrogénèse pulmonaire et que ceci pourrait contribuer au processus de fibrose pulmonaire. En effet, peu présent en temps normal dans les tissus adultes, l'expression de PRRX1 se trouve augmentée dans le noyau des fibroblastes chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Nous avons confirmé ces résultats *ex vivo* par immunohistochimie et *in*

in vitro sur des fibroblastes en culture. PRRX1 permettrait aussi de maintenir les fibroblastes dans un état indifférencié. Ainsi l'utilisation de différents modèles de fibrose chez la souris nous permettrait de valider le rôle du facteur de transcription PRRX1 comme cible thérapeutique dans la fibrose pulmonaire.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation de souris pour modéliser le développement de la fibrose pulmonaire.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisé sera celui nécessaire afin d'atteindre les objectifs du projet. La pathologie humaine de la fibrose pulmonaire affectant les adultes nous utiliserons des souris de 8 à 12 semaines. En respectant ces exigences de remplacement (utilisation de la culture cellulaire), de réduction (calcul du nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir réaliser des analyses statistiques, nous avons calculé que le nombre d'animaux nécessaire à cette étude serait d'un total de 896 souris pour l'ensemble des expériences ;

Raffiner : Les prélèvements issus des animaux seront utilisés pour plusieurs types d'analyses.

12919 Ce projet s'inscrit dans la réalisation de tests d'instillations intra-nasales chez la souris. Ce geste technique pose deux conditions : une bonne immobilisation de l'animal pour son exécution et le choix d'une anesthésie non gazeuse pour éviter toute interaction avec la substance administrée dans les voies respiratoires de la souris.

C'est pourquoi nous nous proposons de tester 3 protocoles anesthésiques fixes (kétamine/xylazine, kétamine/médétomidine/atipamézole et propofol/fentanyl) injectés par voie intra-péritonéale afin de comparer le protocole utilisé actuellement (Kétamine/xylazine) à de nouveaux protocoles qui permettraient une anesthésie moins longue tout en garantissant une bonne analgésie, le geste technique étant d'une durée courte (< 5 minutes). L'anesthésie fixe adaptée à ces instillations doit donc être de courte durée et permettre une récupération rapide des animaux en post-anesthésie.

La profondeur et la durée de l'anesthésie seront évaluées par un monitoring respiratoire et des tests réflexes.

Cette étude vise également à comparer les différents protocoles chez 3 souches de souris communément employées en recherche (SWISS, C57Bl6/J et Balb/c) ; les deux sexes et l'âge des animaux étant également pris en compte. Deux sessions d'expérimentations des mêmes protocoles d'anesthésie seront menées : la première, l'étude pilote, permettra d'adapter le monitoring de l'anesthésie de la seconde, l'étude principale permettra de comparer les différentes méthodes employées.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Notre étude fait suite au projet de test d'instillations nasales sur souris qui ne peut pas être remplacé.

Réduire : 14 souris de chaque souche dont quatre pour l'étude pilote, seront utilisées pour pouvoir comparer les 2 sexes. Les mêmes animaux seront anesthésiés plusieurs fois pour tester chaque protocole anesthésique afin de limiter le nombre total d'animaux utilisés. Un total de 42 animaux seront inclus dans le projet.

Raffiner : Suite à l'expérience, les animaux ne seront pas mis à mort dans le cadre du laboratoire et seront placés. Pour satisfaire leurs besoins vitaux, les animaux seront logés à 5/cage pour l'étude principale et 2/cage pour l'étude pilote, sexes séparés, avec du matériel d'enrichissement (sizzle Dry transféré à chaque change). Enfin, l'acte principal de cette étude reste une anesthésie, acte peu douloureux, les anesthésiques étant injectés par voie intra-péritonéale comme l'état de l'art le prévoit pour ces petits mammifères.

12920 La pharmacologie de sécurité est un élément réglementaire incontournable dans le développement préclinique des médicaments. Avant les études cliniques, les effets du candidat médicament sur les « fonctions vitales » (systèmes cardiovasculaire, respiratoire et nerveux central) doivent d'abord

être étudiés et caractérisés chez l'animal. Le potentiel de pharmacodépendance et d'abus doit être caractérisé pour tout médicament actif sur le système nerveux central.

Le test de préférence de place conditionnée chez le rat permet de mettre en évidence des effets motivationnels pouvant conduire à une dépendance après plusieurs administrations.

Ce projet est conçu en accord avec le principe des 3Rs:

Remplacer : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la mise en place des phénomènes de dépendance. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduire : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1500 animaux sur 5 ans.

Raffiner : Dans ce projet, le raffinement est obtenu par un suivi avant administration du comportement de l'animal selon l'échelle de cotation spécifique de comportement (associé à un suivi de son poids, de son aspect physique) de façon à déceler tout signe de mal-être et d'inconfort. Les prélèvements seront réalisés sous anesthésie.

12921 Les affections ostéoarticulaires chroniques ou rhumatismales sont une des premières causes de morbidité au monde aussi bien en santé humaine qu'en santé animale. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique par de l'inflammation entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité. Les deux maladies rhumatismales les plus fréquentes sont l'arthrose (ou ostéoarthrite) et l'arthrite rhumatoïde (AR).

L'arthrose est causée par la dégénération des articulations due à une usure progressive du cartilage. En plus de cette usure, l'arthrose est associée à un remodelage des os sous cartilagineux, la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes), un affaiblissement des ligaments et des muscles et dans les cas les plus sévères, une inflammation articulaire. L'arthrite rhumatoïde est une maladie chronique auto-immune caractérisée par des poussées inflammatoires touchant de façon progressive de nouvelles articulations. Ces poussées inflammatoires sont associées à une invasion leucocytaire de la synoviale, à des destructions osseuses et cartilagineuses ainsi qu'à un remodelage articulaire anarchique.

Les traitements des maladies rhumatismales sont basés principalement sur le soulagement de la douleur intense et de l'inflammation. Il n'existe malheureusement à ce jour, aucun traitement permettant de guérir les rhumatismes notamment la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre les rhumatismes chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale.

Notre société développe des molécules bifonctionnelles associant chimiquement un vecteur ciblant l'environnement ostéoarticulaire à des molécules chimiques possédant des activités antirhumatismales. Les vecteurs que nous utilisons sont l'hydroxybisphosphonate (HBP) ciblant l'os ou l'ammonium quaternaire ciblant le cartilage. La vectorisation de différents types de molécules chimiques dans le tissu ostéo-cartilagineux facilite leur pénétration et augmente leur concentration locale, prolonge leur localisation sur site, tout en diminuant leur concentration circulante (souvent responsable d'effets secondaires). De plus, les vecteurs HBP peuvent être confectionnés à façon pour bloquer l'activité ostéorésorptive associée aux pathologies rhumatismales.

Ce projet a donc pour but de développer des nouvelles molécules pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse. Les molécules synthétisées seront dans un premier temps testées *in vitro* puis *in vivo*. L'objectif de ces études précliniques est de sélectionner les meilleurs candidats thérapeutiques.

La procédure1 : Optimisation de 3 modèles de pathologies rhumatismales chez la souris et/ou le rat afin de récapituler l'ensemble des affections liées aux rhumatismes chez l'homme. (90 souris et 270 rats).

Procédure 2 : Les molécules retenues pour les tests in-vivo seront testées chez la souris et/ou le rat et administrées à différentes concentrations dans le but de déterminer la dose maximale tolérable et de choisir la dose qui sera ensuite utilisée lors des tests d'activité (336 souris et 336 rats).

Procédure 3 : Nous évaluerons l'efficacité des différentes molécules sur les trois modèles de pathologies rhumatismales. Les molécules seront testées chez la souris et/ou le rat (selon le modèle). Les molécules seront retenues pour leur efficacité contre l'inflammation, la résorption osseuse et la résorption cartilagineuse (824 souris et 1834 rats).

Nos études seront planifiées pour respecter la règle des 3R (Remplacer, réduire, raffiner).

Remplacer : Les molécules synthétisées seront dans un premier temps testées et sélectionnées *in vitro* afin de comparer leur cytotoxicité et leur efficacité par rapport aux molécules natives sur des modèles cellulaires ce qui permettra de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo*.

Réduire : Les tests d'efficacité des molécules seront dans la mesure du possible regroupés afin de limiter le nombre d'animaux, en utilisant un même groupe contrôle pour comparer plusieurs molécules bifonctionnelles. De plus, le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessairement réaliser une deuxième étude. Sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 3690 animaux.

Raffiner : Nous mettrons en place des mesures spécifiques et adaptées aux douleurs occasionnées par les rhumatismes pour éviter toute souffrance inutile et prolongée : les conditions d'hébergement seront optimisées (litière spécifique, augmentation de l'enrichissement, facilité d'accès à l'alimentation et ajout de nourriture appétente), nous utiliserons un anesthésique et des tapis chauffants lors de l'induction de la pathologie, des traitements antalgiques pré et post induction et dès l'apparition des premiers signes inflammatoires. Un suivi quotidien des animaux sur des caractéristiques spécifiques (gonflement, locomotion et sensibilité mécanique) sera effectué. Tout animal ayant atteint un ou plusieurs des points limites (repérés le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien et en s'appuyant sur des grilles de bien-être animal adaptées à chaque modèle) sera euthanasié. Nous maintiendrons les animaux le minimum de temps dans une situation d'inconfort et de douleur (lors du traitement expérimental et lors des prises de mesures). Dans la mesure du possible, la prise de mesures sera effectuée dès l'apparition de la première phase de douleur aiguë de manière quotidienne et seulement deux fois par semaine dans les phases de douleurs chroniques. Si la prise de mesure nécessite néanmoins une réactivité sensorielle de l'animal malgré une douleur pathologique (exemple lors de mesure de sensibilité mécanique), l'animal recevra un traitement antalgique le plus tôt possible après mesure.

A terme, les meilleurs candidats devront ensuite faire l'objet d'études précliniques complémentaires réglementaires répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation), afin de retenir une molécule qui pourra alors être administrée chez le patient dans le cadre d'essais cliniques humains ou vétérinaires. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques aux patients atteints de rhumatismes.

12922 Suite à l'obtention de résultats très prometteurs montrant l'efficacité d'un traitement de thérapie génique dans le cadre de la glycogénose de type 1a, une étude préclinique réalisée chez la souris devrait permettre de proposer une thérapie pour les patients atteints de cette maladie génétique rare. Cette maladie est due à une perte de la production de glucose (sucre) par le foie, les reins et l'intestin. Cette fonction permet de maintenir la glycémie (taux de sucre dans le sang) autour de 1g/l en dehors des périodes de repas. Ainsi, les patients atteints de glycogénose de type 1a développent des hypoglycémies sévères rapidement après un repas qui peuvent conduire au coma hypoglycémique et à la mort. En absence de traitement, ces patients doivent manger très régulièrement, y compris la nuit, en suivant un régime très strict pour éviter les pathologies

associées à l'accumulation de glycogène (stock de sucre) et de graisses dans le foie et les reins. La plupart des patients développent un foie gras et des tumeurs hépatiques, ainsi qu'une maladie rénale chronique dès l'adolescence.

La preuve d'efficacité de la molécule utilisée pour la thérapie génique a été démontrée dans un modèle de souris unique qui reproduit toute la pathologie humaine hépatique de la glycogénose de type 1a, sans mourir de coma hypoglycémique. Cependant, ces souris ne peuvent pas utiliser leur stock de glycogène hépatique pour maintenir leur glycémie juste après un repas ; ainsi elles peuvent présenter des hypoglycémies modérées dans les premières heures de mise à jeun, mais elles sont capables de réguler ensuite leur glycémie si le jeûne se prolonge grâce à une induction de la production de glucose par les reins et l'intestin, organes non touchés par la maladie.

Lors d'une étude précédente, l'injection de la molécule étudiée, administrée par voie intraveineuse, a permis aux souris atteintes de glycogénose de type 1a (spécifiquement dans le foie) de diminuer significativement les stocks de glycogène hépatique après un jeûne prolongé de 24h et de réguler leur glycémie comme les souris non malades. L'efficacité du traitement est dépendante de la dose et a été maintenue pendant environ 10 jours, voire 2 semaines. Avant de proposer une étude clinique, des études plus précises pour déterminer la dose optimale à injecter n'entraînant pas de réponse immunitaire, ainsi que les fréquences d'injection et la formulation la plus efficace sont nécessaires. De plus, seules les cellules du foie sont ciblées actuellement par la molécule aux doses testées. D'autres études nécessitent de montrer son efficacité au niveau du rein.

Dans ce projet, nous proposons de tester l'efficacité de différentes doses et de nouvelles formulations, pour prévenir les pathologies hépatiques et rénales, dans des modèles de souris atteintes de glycogénose de type 1a spécifiquement dans le foie ou dans les reins, respectivement. Le modèle de souris dépourvues de production de glucose par les reins reproduit toute la pathologie rénale des patients atteints de glycogénose de type 1a, sans développer d'hypoglycémie. Dans tous les cas, les études seront réalisées chez de jeunes animaux adultes, sans atteindre le développement avancé de la pathologie hépatique et rénale.

Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacer : L'efficacité des molécules à tester a été déjà validée *in vitro* en cellules mais seul le traitement des animaux atteints de GSD1 permettra de valider leur efficacité sur le tissu ciblé, c'est à dire le foie ou les reins, après leur injection dans la circulation sanguine.

Réduire : Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ces modèles animaux et du métabolisme glucidique (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes d'un minimum de 6-8 souris seront analysés. Afin de réduire le nombre d'animaux, un animal pourra être traité avec une molécule à une dose donnée, puis, après une période sans traitement d'au moins 15 jours, l'animal pourra être traité avec une autre dose ou une autre formulation. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 240 souris mâles transgéniques et de 60 souris non transgéniques utilisées comme contrôles. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction ou incluses dans un autre projet. Au total, cette étude nécessitera 300 souris sur une durée de 2 ans.

Raffiner : Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Un anesthésique local sera appliqué avant l'injection dans la veine de la queue ou une prise de sang. Pour la maladie hépatique, la connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites, en contrôlant les périodes de risque d'hypoglycémie. Généralement, les mises à jeun seront limitées à 2h pour réduire le mal-être des animaux non traités. L'atteinte des points limites lors d'une mise à jeun entraîne l'injection de glucose et la renutrition de la souris. Pour limiter les hypothermies liées au développement des hypoglycémies, les animaux auront la possibilité de se réchauffer en disposant une partie de la cage sur une plaque chauffante. Pour la maladie rénale, l'apparition des premiers signes d'atteintes rénales sera suivie par le dosage urinaire et sanguin de marqueurs comme l'albuminurie. Comme chez l'homme, les premiers stades de développement de

la maladie rénale sont silencieux (pas de signe de mal-être). Tous les protocoles seront réalisés avant le développement d'une insuffisance rénale, caractérisée par l'apparition de déchets dans le sang, ou l'apparition de tumeurs hépatiques. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces études réalisées chez la souris pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la glycogénose de type 1a.

12923 L'imagerie moléculaire, notamment par tomographie par émission de positons (TEP), est un outil largement validé et utilisé en oncologie générale. Elle est cependant sous employée en neuro-oncologie alors même que l'évaluation en imagerie des gliomes est un des points fondamentaux dans la prise en charge des patients. La détection et le suivi d'un gliome augmente considérablement les chances de réussite de traitements. L'imagerie des tumeurs cérébrales doit relever de nombreux défis, notamment celui de l'estimation précise de l'activité de la tumeur et de son volume actif. Cependant, très peu d'agents d'imagerie, ou marqueurs, en TEP clinique permettent de diagnostiquer et de suivre l'évolution des tumeurs cérébrales.

Notre laboratoire est engagé depuis plusieurs années dans l'imagerie *in vivo* par TEP sur différents modèles de cancer tels que les cancers du sein, du cerveau (notamment le gliome) et du poumon. La compréhension de l'interaction des marqueurs avec leur cible permettra de proposer des méthodes d'imagerie pour le diagnostic et le suivi thérapeutique. Elle permettrait également d'optimiser les traitements en améliorant leur dose tout en prévenant l'apparition d'effets indésirables. Cette compréhension exige de connaître l'action des médicaments sur l'organisme (étude en pharmacodynamique) et le devenir des médicaments dans l'organisme (étude en pharmacocinétique) du marqueur.

Les approches de pharmacologie *in vitro* produisent des informations à l'échelle de la cellule sur l'interaction du marqueur et de sa cible. Des marqueurs peuvent être ainsi sélectionnés/modifiés. Cependant ces approches *in vitro*, bien que nécessaires, ne sont pas suffisamment prédictives de l'efficacité et/ou de la toxicité du marqueur. Ces dernières dépendent du devenir du marqueur dans l'organisme, de sa disponibilité au niveau des tissus cibles dont la structure et la composition sont extrêmement complexes. Pour notre étude, des modèles rongeurs seront utilisés. Son objectif est de mettre au point pour plusieurs marqueurs un protocole d'imagerie TEP capable de révéler leur interaction avec leur cible biologique. Aux doses prévues dans cette étude, aucune toxicité ni aucune souffrance ne sont attendues : l'imagerie TEP, technique non invasive, est très sensible et ne nécessite donc pas d'injection intraveineuse importante du marqueur. Pour réaliser les examens d'imagerie TEP, un radiotracer spécifique d'une cible pharmacologique est utilisée. Ces examens sont réalisés chez des animaux « contrôle » ayant reçu un placebo, et chez des animaux ayant reçu le traitement testé à différentes doses.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le recours à un modèle *in vivo*, et donc un modèle animal, est alors indispensable. L'imagerie TEP permet, grâce à un système de radiomarquage, de mesurer l'interaction du médicament avec sa cible biologique et de suivre sa distribution dans les différentes régions de l'organisme.

Réduire : Sur la base des résultats attendus, le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés, serait de 555 sur la durée de l'étude, c'est-à-dire 5 ans. Ce nombre d'animaux a été calculé (i) pour démontrer les performances diagnostiques des biomarqueurs d'imagerie et (ii) pour mettre en évidence un effet thérapeutique statistiquement significatif.

Raffiner : Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole ce qui permet de diminuer l'état de stress et d'améliorer leur bien-être. Ils seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Les interventions sur les animaux sont réalisées sous anesthésie pour éviter d'éventuelles douleurs. Les animaux seront étroitement suivis tout au long de l'étude, permettant l'application des critères d'arrêt en amont afin d'empêcher toute souffrance animale.

12924 L'infarctus du myocarde touche environ 120. 000 personnes par an en France. C'est une pathologie caractérisée par une mort des cellules myocardiques consécutive à une ischémie myocardique prolongée (défaut d'apport sanguin). La durée totale de cicatrisation suite à la nécrose post-ischémique des cellules (de l'occlusion d'une artère coronaire à la réparation tissulaire avec tissu de cicatrisation fibreux) prend chez l'homme environ 5 à 6 semaines.

Chez les patients qui se présentent avec un tableau d'infarctus du myocarde, une reperfusion doit être entreprise dans les 12 heures qui suivent l'apparition de la douleur car la rapidité de reperfusion est directement corrélée au pronostic du patient, intra et post-hospitalier. Malheureusement, on estime selon les études la proportion de patients se présentant au-delà de ces délais entre 8. 5 et 40 %. Leur pronostic est très péjoratif avec une mortalité globale presque deux fois supérieure (21. 2 vs 12. 7 %) à la mortalité observée dans la population des infarctus pris en charge dans les 12 heures suivant le début de la douleur. Par ailleurs, des études ont montré qu'une reperfusion coronaire mise en place après les 12 premières heures de symptomatologie douloureuse et/ou de modifications électrocardiographiques n'apportait plus de bénéfice comparé au traitement médical seul.

L'avenir de ces patients étant directement corrélé à l'importance de la masse myocardique nécrosée, une complication rencontrée lors d'infarctus massif est l'apparition d'une insuffisance cardiaque conduisant parfois à la nécessité de recourir à un programme de transplantation ou, à défaut, d'aboutir au décès du patient. Ainsi, très régulièrement, pour des patients qui se présentent tardivement après leur infarctus du myocarde, il existe une période de quelques semaines avant la réparation fibreuse du myocarde et le remodelage ventriculaire pendant laquelle la greffe de cellules souches myocardiques pourrait améliorer le remodelage ventriculaire gauche, voire la régénération myocardique.

Différents essais cliniques de thérapie cellulaire cardiaque ont été menés dans les 10 dernières années et ont montré l'impact positif de l'injection de cellules pendant la phase aiguë de l'infarctus du myocarde pour favoriser une meilleure réparation tissulaire post-infarctus. Les objectifs identifiés sont

(1) agir sur la zone bordante de l'infarctus (zone géographiquement intermédiaire entre la zone définitivement nécrosée et le myocarde « sain ») en luttant contre les phénomènes ischémiques puis inflammatoires qui favorisent la mort cellulaire et une majoration de la dysfonction cardiaque sur le long terme,

(2) contrôler les mécanismes inflammatoires et pro-fibrotiques lors de la réparation de la zone infarctée pour éviter secondairement un remodelage maladaptatif de cette zone et l'évolution vers l'insuffisance cardiaque.

Ainsi, l'injection de cellules souches mésenchymateuses (CSM) après un infarctus permet une amélioration de la fonction cardiaque ainsi qu'une préservation du remodelage du ventricule gauche dans les modèles précliniques, tandis que plusieurs essais cliniques de phase II utilisant l'injection de CSM ont permis de montrer l'absence de risques pour les patients et un bénéfice thérapeutique potentiel. La voie privilégiée d'injection des CSM chez l'Homme est la voie endomyocardique. Cependant, la rétention cardiaque de ces cellules est estimée à 10-15% à 1 heure post-injection et à 10-11% à 24 heures post-injection, cette faible rétention cellulaire constitue donc un facteur limitant majeur.

L'injection intramyocardique combinée de CSM + un hydrogel chez le rat avec infarctus permet une amélioration de la rétention cellulaire, une augmentation de la survie à long terme des cellules après injection, une potentialisation de l'efficacité thérapeutique de cette thérapie cellulaire combinée. Les résultats montrent à 28 et 56 jours post-infarctus une limitation de la zone infarctée, une baisse du pourcentage de fibrose et une amélioration de la fonction cardiaque.

Il apparaît maintenant important d'évaluer *in vivo* la faisabilité et la preuve de concept de l'utilisation de cette thérapie cellulaire combinée à un hydrogel dans l'amélioration de réparation cardiaque post-infarctus dans un modèle animal préclinique. Ce projet offrira les résultats préalables indispensables avant d'envisager les premiers essais cliniques chez l'homme. L'évaluation du bénéfice de cette stratégie thérapeutique innovante associera :

(1) l'analyse de la fonction et du remodelage ventriculaire gauche par IRM à 4 semaines après injection,

(2) une étude histologique des zones injectées pour rechercher la présence de CSM et identifier in situ les mécanismes thérapeutiques impliqués.

Dans le cadre des 3Rs :

Remplacer: L'évaluation de l'efficacité thérapeutique de l'injection in situ d'un hydrogel cellularisé dans le traitement de l'infarctus du myocarde ne peut être démontrée que par évaluation *in vivo*. Le modèle porc est choisi en raison de la grande proximité anatomique et biomécanique entre les cœurs humain et porcin.

Réduire: Le nombre d'animaux prévu dans ce projet est réduit au minimum avec un objectif fixé afin d'obtenir des résultats significatifs permettant de conclure sur la pertinence de notre approche. Pour ce faire, un suivi longitudinal *in vivo* par imagerie (IRM) est réalisé afin de limiter au maximum le nombre d'animaux euthanasiés tout en obtenant des résultats pertinents sur l'état de l'infarctus. Le nombre total d'animaux prévus sur 5 années est de 24 porcs.

Raffiner: Les animaux seront hébergés dans des conditions adaptées à l'espèce avec enrichissement du milieu. Tous les animaux auront libre accès à l'eau et à la nourriture durant toute la durée des expériences. Les animaux seront surveillés tous les jours par les animaliers et le vétérinaire traitant. Les procédures sont réalisées avec des techniques minimalement invasives et sous anesthésie générales (cathétérisme intracardiaque par l'artère fémorale, IRM)

12925 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un cours intensif de 3 semaines sur l'imagerie du cerveau entier qui permettra aux participants de se familiariser avec la théorie et la pratique de méthodes avancées d'investigation des relations structure-fonction du cerveau au niveau des organes. Il mettra en balance les exposés d'experts en neuroimagerie reconnus dans le monde entier, de démonstrations expérimentales et de travaux pratiques en laboratoire par petits groupes. Les participants seront initiés à un large éventail de techniques permettant d'analyser l'architecture cérébrale et des méthodes d'imagerie 3D *in vivo* utilisant la résonance magnétique, les ultrasons, la spectroscopie dans le proche infrarouge, les ondes électromagnétiques et la tomographie par émission de rayons gamma. Les problèmes associés à la multimodalité de la neuroimagerie du cerveau entier et au partage des données seront également abordés. Chaque participant aura la possibilité d'acquérir et d'analyser des données de neuroimagerie cérébrale dans des environnements précliniques et cliniques.

Concernant l'aspect préclinique, les étudiants utiliseront les méthodes IRM les plus récemment développées pour obtenir des informations anatomiques et fonctionnelles du cerveau de petits animaux (souris et rats). Cependant, seuls les participants formés à l'expérimentation animale seront autorisés à manipuler les animaux, notamment pour les installer dans l'IRM.

Respect de la règle des 3R :

Replacer : Les animaux sont un maillon indispensable pour étudier le fonctionnement cérébral et développer des séquences IRM adaptées, avant le transfert à l'homme. Les procédures expérimentales décrites dans le projet ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Le modèle petit animal semble incontournable afin d'étudier en profondeur l'anatomie mais aussi le fonctionnement cérébral.

Réduire : Le nombre total d'animaux envisagé pour cette école est de 8 souris et 8 rats, car 4 groupes de 2 étudiants participeront. Ceci permettra l'étude par IRM du cerveau d'animaux sains, soit pour obtenir des informations anatomiques, soit obtenir des informations pendant un stimuli visuel ou suite à l'activation des vibrisses.

Raffiner : Les animaux seront gardés dans des cages contenant des bâtonnets de bois à ronger, matériaux de construction de nid, coton, maisonnette, tubes en carton, de la paille, de la nourriture

et de l'eau à volonté. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement. Si certains animaux présentent des signes de souffrance ou d'inconfort, ils seront pris en charge par une médication adaptée, des soins et/ou des techniques de nursing.

12926 En France, le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme. Le développement de traitements d'immunothérapie stimulant le système immunitaire (c'est-à-dire les défenses de l'organisme) a permis d'améliorer fortement la prise en charge de certains cancers, en particulier du mélanome et du poumon. Cependant, seuls 30% des patients répondent à ces traitements. On sait maintenant que le système immunitaire a un rôle très important dans le contrôle et l'élimination des tumeurs. Mais ces tumeurs arrivent à développer des mécanismes leur permettant de se rendre invisibles au système immunitaire (mécanismes d'immunosuppression). Différents travaux ont pu montrer que l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation des vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur, avait un impact sur le développement de ces mécanismes d'immunosuppression. Nous proposons dans ce projet de comprendre comment l'angiogenèse peut moduler ces mécanismes d'immunosuppression. Des molécules ciblant l'angiogenèse, appelées molécules anti-angiogéniques, ont été développées et sont actuellement utilisées pour le traitement de patients atteints de cancer. La première partie de ce projet consistera à étudier l'impact de différentes molécules anti-angiogéniques sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Des souris porteuses de tumeurs seront traitées avec différents anti-angiogéniques, agissant sur différentes cibles moléculaires. La croissance tumorale et la réponse immunitaire et les mécanismes d'immunosuppression seront ensuite étudiés.

La seconde partie de ce projet consistera à proposer de nouvelles associations en combinant ces molécules anti-angiogéniques à différents traitements d'immunothérapie. Pour cela, des souris porteuses de tumeurs recevront une immunothérapie en association avec ces traitements anti-angiogéniques. La croissance tumorale sera suivie, et les réponses immunitaires seront analysées.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Les liens entre tumeur, angiogenèse et système immunitaire étant complexes et dynamiques, seule l'étude *in vivo* et donc l'expérimentation animale permettent d'analyser et comprendre cette interaction.

Réduire : Les procédures expérimentales de ce projet ont toutes fait l'objet d'une réflexion consciencieuse et approfondie et ont été élaborées, afin d'utiliser le moins d'animaux possibles, tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement satisfaisants. Certains paramètres expérimentaux ont déjà été déterminés dans des projets précédents (nombre de cellules tumorales à injecter, cinétique d'injection des traitements anti-angiogéniques) et permettront ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ces expériences. Chaque procédure expérimentale sera optimisée afin de récupérer le maximum d'échantillons sur le même animal pour réaliser toutes les analyses et limiter le nombre d'animaux utilisés. Cette étude nécessitera un total de 1380 souris sur 5 ans.

Raffiner : Nous nous efforcerons de réduire au maximum la souffrance de l'animal en utilisant des antalgiques ou en anesthésiant les animaux lorsque cela est nécessaire. Des points limites sont définis pour chaque procédure dans l'objectif de réduire au maximum la souffrance de l'animal.

A terme, ce projet permettra d'élucider les mécanismes d'immunosuppression induits par la tumeur. Et ainsi d'améliorer les traitements existants, en proposant de nouvelles associations thérapeutiques chez les patients atteints de cancer.

12927 L'imagerie fonctionnelle cérébrale permet de comprendre comment les structures du cerveau se parlent entre elles. Aujourd'hui, la seule technique permettant de réaliser une cartographie fonctionnelle tridimensionnelle est l'IRM, une technique qui a cependant des limitations importantes, notamment une faible résolution spatiale et temporelle et la nécessité d'anesthésier les animaux ce qui modifie considérablement leur fonction cérébrale. La possibilité d'une détection non invasive de l'altération des réponses cérébrales dans le cerveau de rongeurs permettrait une meilleure compréhension des pathologies, et le développement de stratégies de traitement.

Le but de ce projet est de prouver l'efficacité de l'imagerie ultrasonore ultrarapide pour le suivi des fonctions cérébrales avec ou sans substances psychoactives (telle que la scopolamine) chez le rongeur anesthésié et éveillé et pour établir une cartographie tridimensionnelle cérébrale à haute résolution temporelle et spatiale. Nos études précédentes ne permettaient d'imager que dans un plan d'imagerie, limitant grandement le nombre de zones analysées. L'une des grandes originalités du projet est l'imagerie tridimensionnelle en imagerie ultrasonore qui permet d'imager tout le cerveau en un temps. Ce projet doit ainsi nous permettre de développer la technique sur des modèles de souris et de rats et de la valider par rapport à l'IRM.

Pour se faire, cette étude nécessitera 220 rats et 220 souris au travers de 6 étapes (5 chez l'animal anesthésié et une chez l'animal éveillé). Ces étapes sont nécessaires pour commencer l'imagerie de façon la plus simple mais malheureusement la plus invasive, pour aller à des approches de moins en moins invasive et en finissant par l'animal éveillé. Les deux modèles de rongeurs (rats/souris) utilisés sont des modèles d'études privilégiés en neuroscience : le rat pour l'étude comportementale et la souris du fait de la richesse des modèles génétiquement modifiés.

Le projet s'inscrit pleinement dans la démarche des 3R pour le bien-être des animaux :

Remplacer : Il nous est impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre du cerveau pour la mesure de l'activité cérébrale.

Réduire au minimum le nombre d'animaux par l'analyse statistique préalable sur la taille des groupes requises pour réaliser l'étude avec significativité.

Raffiner les manipulations par l'utilisation d'une technique minimalement invasive. La chirurgie sera pourtant nécessaire lorsque l'imagerie transcranienne n'est pas réalisable. Dans ces cas précis, nous prendrons grand soin de minimiser la douleur et la souffrance. Une surveillance régulière sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. Les animaux sont hébergés dans des cages dans des armoires ventilées, avec alimentation et eau illimités, et avec un enrichissement du type tunnel en carton.

12928 L'obésité, est une maladie chronique exposant à de nombreuses complications contribuant à l'augmentation du risque cardiovasculaire et au développement de pathologies métaboliques sévères tel que le diabète de type 2. Les approches thérapeutiques pour lutter contre ce fléau sont rares et il est urgent d'identifier de nouvelles stratégies de lutte contre l'obésité. Des études réalisées *in vitro* et sur des modèles animaux tendent à démontrer un impact d'une supplémentation en vitamine D sur la biologie du tissu adipeux suggérant un lien de causalité entre insuffisance en vitamine D caractérisée par un faible taux plasmatique de 25-hydroxyvitamine D d'une part et obésité. Par ailleurs, l'exercice physique, reconnu pour son action bénéfique sur l'accumulation du tissu adipeux, peut aussi moduler l'angio-adaptation de celui-ci. Certaines récentes études cliniques prospectives ainsi que de récents travaux réalisés chez des souris suggèrent ainsi fortement un rôle potentiellement bénéfique d'une approche intégrée associant un apport contrôlé en vitamine D et la pratique régulière d'une activité physique afin de lutter contre le développement d'une obésité sévère et des risques cardiovasculaires qui lui sont associés. Nous proposons d'étudier les effets d'une supplémentation en vitamine D3 associée ou non à de l'exercice physique sur roue volontaire (15 semaines) dans un modèle de souris C57Bl/6 devenues obèses et diabétiques après un régime High Fat/High Sucrose (HFS) de 10 semaines. L'objectif principal de ce projet sera d'étudier l'impact de cette stratégie de 15 semaines sur l'adiposité, la beigisation des tissus adipeux et ses conséquences sur la fonction vasculaire et de caractériser les mécanismes moléculaires intervenant dans les processus observés. D'un point de vue méthodologique, 70 souris seront nécessaires afin de pouvoir mener à bien toutes les analyses fonctionnelles, histologiques et biochimiques. Nous soumettrons des souris C57Bl/6 à une alimentation riche en graisse et en sucre puis les soumettront soit à une activité physique volontaire, soit à une supplémentation en vitamine D3 soit à une activité physique couplée à la supplémentation vitaminique. Des évaluations longitudinales (suivi pondéral, pressions artérielles et test de tolérance au glucose et à l'insuline) seront réalisées afin de pouvoir

suivre l'évolution des paramètres d'intérêt tout au long du protocole, chaque souris étant son propre contrôle, ce qui permettra de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 R :

Remplacer : A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier les effets intégrés d'une supplémentation chronique en vitamine D3 et l'activité physique sur l'adiposité et le phénomène de beigisation du tissu adipeux. En effet, ces processus résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus de l'organisme et impliquent des processus biologiques d'origine aussi bien systémiques que locales, évoluant suivant le développement de la pathologie. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme.

Réduire : Malgré une multitude d'approche possible d'activité physique et différents dosages de vitamine D3 nous nous concentrons sur une combinaison type (activité en roue et un dosage de vitamine D3) afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, le nombre d'animaux (n=70) est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffiner : Un enrichissement de l'environnement sera utilisé (igloos, tubes, coton) pour permettre la création de nids et de bâtonnets en bois à ronger. Les méthodes pour réduire ou supprimer la souffrance seront également utilisées: 1/ Le stress des souris sera réduit par des séances d'habituation aux procédures impliquant une manipulation de l'animal éveillé. Les souris seront visitées quotidiennement. En cas de blessure/souffrance, l'animal peut être soigné ou euthanasié selon le degré d'atteinte 2/ avant toute mesure d'IPITT et IPGTT, de la lidocaïne est appliquée à l'endroit du prélèvement. 3/ Par ailleurs, les animaux seront surveillés dans l'heure après les tests, en fin de journée et dès le lendemain matin pour évaluer leur état clinique. Enfin, une échelle de scores cliniques a été mise en place pour le suivi tout au long du protocole. Nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle quotidien à minima de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux. Si nécessaire, la prise de décision d'euthanasie est réalisée avec le responsable de l'animalerie. Le score total possible sur notre grille qui est proposée en annexe du document est de 18. 4/ Pour les mesures de pression artérielle, les souris ont plusieurs séances d'habituation avant d'entamer les mesures qui seront incluses dans le protocole de recherche. Enfin 5/ Le prélèvement terminal de sang est réalisé sur les animaux profondément anesthésiés. Après mise à mort par dislocation cervicale, différents tissus sont prélevés.

12929 Les dispersants (mélanges de tensio-actifs liquides et de solvants) sont utilisés pour accélérer la dispersion naturelle du pétrole par la houle en cas de déversement accidentel en mer. Dans un souci de protection de l'environnement et afin de garantir une efficacité optimale, l'utilisation des dispersants dans certaines zones maritimes, en particulier proches du littoral, est interdite, limitée ou soumise à une autorisation préalable. Afin de suivre la réglementation française et être potentiellement utilisés lors de pollutions accidentelles, un dispersant doit valider trois contrôles : son efficacité, sa biodégradabilité et sa non toxicité sur la crevette marine. Cependant, l'utilisation du test sur la crevette, appliqué seulement en France, n'est plus très pertinente car cette espèce benthique côtière n'est pas représentative des zones d'utilisation possibles des dispersants et elle apparaît être peu sensible aux nouvelles générations de dispersants. Ce projet a pour objectif de proposer un protocole de test de toxicité aiguë plus adapté, en se basant sur des protocoles existants et reconnus internationalement.

En pratique, ce projet s'attachera à déterminer la concentration qui provoque la mort de 50% d'une population d'animaux, ou CL50, de deux dispersants et d'un produit tensio-actif de référence en utilisant trois tests ciblant trois organismes marins pélagiques de niveaux trophiques différents : une espèce d'algue, de zooplancton (petit crustacé) et de poisson ; ceci permettra d'identifier le(s) test(s) le(s) plus approprié(s) pour évaluer la toxicité de dispersants sur la base de leur sensibilité, représentativité et coût, en limitant, si possible, l'utilisation de vertébrés tels que les poissons.

Le test « poisson » sera réalisé sur le bar *Dicentrarchus labrax*, espèce pélagique, représentative des eaux européennes, disponible commercialement, qui est classiquement utilisée en expérimentation car sa biologie est connue et sa zootechnie est maîtrisée. Dans ce projet, trois essais impliquant chacun 84 poissons juvéniles seront réalisés successivement, ainsi au total, $3 \times 84 = 252$ poissons seront soumis à une procédure expérimentale durant l'ensemble du projet (277 poissons seront achetés, soit 10% en plus afin de palier une éventuelle mortalité). Chaque essai consistera à exposer en conditions semi-statiques (c'est-à-dire avec renouvellement quotidien de la solution d'exposition), en duplicat, 7 poissons à une condition contrôle (eau de mer) et à cinq concentrations de produits pendant 96h (7 poissons en duplicat \times 6 conditions = 84 poissons par essai), et ainsi déterminer la CL50 avec un intervalle de confiance à 95% après 96h d'exposition à l'aide d'une interface de statistique dédiée (MOSAIC).

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacer : Les essais réalisés dans ce projet nécessiteront l'utilisation de poissons vivants car l'objectif est d'évaluer la toxicité d'une substance à l'échelle de l'organisme (via la mesure de la mortalité). Il a, par contre, été décidé de ne plus avoir recours à des poissons vivants pour réaliser les tests préliminaires visant à déterminer la gamme de concentration à tester lors des essais. Dans le présent projet, les concentrations à tester ont été déterminées à partir des données de la littérature ainsi que des résultats italiens obtenus. Elles seront, si nécessaires, affinées à l'aide des résultats des essais de toxicité réalisés sur les algues marines et zooplancton marins.

Réduire : Le nombre d'individu sera fixé à 7 par bac, ce qui est le minimum préconisé pour ce test, et les expositions seront réalisées en duplicat plutôt qu'en triplicat.

Raffiner : Les poissons seront placés en permanence dans des conditions physico-chimiques et à une densité adaptée à leur espèce. Pendant l'ensemble du projet, un suivi visuel régulier de leur état de santé sera effectué afin de surveiller l'apparition de pathologies et de s'assurer du bien-être des animaux. Lors des protocoles, les poissons seront anesthésiés lors des transferts de bacs et, en fin d'essai, la norme pour la détermination de CL50 implique le sacrifice des poissons. Un suivi régulier de la qualité de l'eau sera également réalisé. Hors phase de procédure expérimentale, les bacs seront placés dans un bac unique enrichi avec des objets (tubes ou caches) afin de leur permettre d'exprimer des comportements qui leur sont propres (nage en banc, cache) et ils seront nourris avec un aliment adapté à leur régime alimentaire (carnivore) et à leur stade de développement (juvénile), fourni sous forme de granulé par un fabricant spécialisé.

12930 Une société développe et vend, depuis plus de 25 ans et dans le monde entier, des systèmes de mesure physiologiques précliniques. Parmi les spécialités de l'entreprise figurent les systèmes implantés de mesures cardiovasculaires. L'objectif du projet est de confirmer le bon fonctionnement et de comparer les performances de deux types de cathéters de mesure de pression. Ces cathéters sont introduits dans une artère ou un ventricule, et la pression mesurée par le cathéter est transmise vers le boîtier électronique implanté. Ce dernier émet un signal radio qui est connecté à distance par des antennes, permettant de recueillir en temps réel plusieurs données physiologiques.

Dans les deux cas on veut vérifier que les dispositifs vont continuer à procurer des signaux stables et fiables en implantation chronique pendant 3 mois. Deux types de dispositifs vont être étudiés :

- Cathéter à extrémité ouverte : il s'agit notamment de vérifier que le gel placé à l'extrémité, en interface entre le sang et un liquide inerte de transmission de pression, est stable dans le temps.
- Cathéter à membrane : c'est un nouveau concept de cathéter fermé, muni à son extrémité distale d'une membrane remplaçant le gel. L'avantage est qu'il n'y a aucun contact entre liquide contenu dans le cathéter et le sang. L'absence d'ouverture facilite aussi l'implantation, en éliminant le risque de perte de gel lors des manipulations chirurgicales. Le risque est une possible dérive de mesure que nous souhaitons évaluer. L'autre risque étant celui d'une rupture de la membrane soumise à des sollicitations en pression à chaque contraction cardiaque.

Les résultats attendus sont de vérifier que le design actuel du cathéter à extrémité ouverte répond aux besoins. C'est la méthode utilisée par un concurrent depuis de nombreuses années et acceptée

par les clients. Il s'agit pour la société innovante de confirmer que le système est au moins aussi performant que celui de la concurrence.

Le cathéter à membrane est une nouvelle technique. Le risque d'échec est en théorie plus élevé, mais si le succès de nos premiers essais se confirme ce serait un produit bien supérieur à la technologie à extrémité ouverte, de par sa simplicité de mise en œuvre et aussi ses potentielles applications cliniques.

Pour répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, le REMPLACEMENT des animaux n'est actuellement pas possible pour ce type de test. Nous avons fixé une limite maximale de 10 brebis au total pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable, tout en REDUISANT le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. Dans cet objectif de réduction, nous ferons en sorte que chaque brebis soit son propre contrôle.

Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures :

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

12931 Le diabète dit sucré est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie. L'insulinothérapie intensive est actuellement la meilleure thérapie permettant de maintenir la glycémie relativement stable et de retarder l'apparition des complications associées aux diabètes de type 1 et type 2 avancés. Néanmoins, un mauvais dosage de l'insuline administrée peut induire le développement d'hypoglycémies. A ce jour, le développement d'hypoglycémies est la principale complication des traitements par insulinothérapie intensive. La détection cérébrale d'une hypoglycémie stimule la prise alimentaire et déclenche des réponses neuroendocrines regroupées sous le terme de contre-régulation à l'hypoglycémie. Au niveau cérébral, notre équipe et d'autres ont montré que des neurones spécialisés dits sensibles au glucose sont impliqués dans la détection de la diminution de la glycémie et l'initiation des processus de contre-régulation et prise alimentaire. Les neurones NPY sont sensibles à une diminution de la concentration en glucose (hypoglycémie) et sont connus pour être impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et de la contre-régulation.

D'un point de vue physiopathologique, les mécanismes de contre-régulation et de stimulation de la prise alimentaire sont altérés à la suite d'épisodes récurrents d'hypoglycémie. L'étude des mécanismes impliqués dans l'altération de la contre-régulation et de la stimulation de la prise alimentaire après hypoglycémies récurrentes chez les patients diabétiques est donc fondamentale.

De manière intéressante, l'inhibition de la contre-régulation à la suite d'épisodes récurrents d'hypoglycémie peut être reversée si les patients diabétiques ne subissent pas d'accident hypoglycémique pendant 2-3 semaines. Cette notion de réversibilité « spontanée » implique que les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de la contre-régulation soient « plastiques » et non figés.

Au niveau du système nerveux central, les connexions entre les neurones sont elles aussi plastiques. Le nombre de connexions synaptiques sur un neurone donné n'est pas figé et évolue en réponse aux stimuli. On parle de plasticité neuronale ou remodelage synaptique. Nous avons récemment montré au laboratoire que le nombre de connexions synaptiques sur des neurones est

altéré en fonction du régime alimentaire. Ainsi, le but du projet de recherche sera de déterminer si des neurones NPY subissent un remodelage synaptique après hypoglycémies récurrentes.

Ce projet appliquera la règle des 3Rs :

Remplacer : Le remplacement des animaux par des modèles cellulaires ou des simulations n'est pas possible pour l'étude de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique.

Réduire : Le nombre d'animaux sera réduit grâce à l'utilisation de tests statistiques.

Raffiner : Toutes les mesures seront prises afin de raffiner les expérimentations : notamment l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques et l'enrichissement des cages, l'habituation. Enfin les points limites ont été définis pour l'ensemble des expérimentations et transmis à tout le personnel impliqué dans ce projet. Un total de 104 souris seront utilisées pour ce projet.

12932 Les neurones du cerveau communiquent entre eux grâce à des neurotransmetteurs au niveau de structures très petites, appelées « les synapses ». Un de ces neurotransmetteurs est la dopamine. Les synapses qui libèrent de la dopamine sont impliquées dans le contrôle moteur de nos mouvements et la sensation de « bien-être ». Elles sont affectées dans la maladie de Parkinson ainsi que dans les troubles psychiatriques comme la dépendance aux drogues et la schizophrénie. Il est donc très important de connaître cette synapse précisément afin de permettre le progrès des approches médicales à ces maladies graves. Dans ce projet, nous souhaitons réaliser la purification biochimique des synapses à dopamine afin d'établir une première caractérisation de leur composition. Nous allons pour cela utiliser une technique de purification appelée FASS (Fluorescence Activated Synaptosomes Sorting) qui nécessite que ces synapses soient rendues fluorescentes. Nous utiliserons donc des cerveaux de souris dont les synapses à dopamine auront été rendus fluorescentes de façon ciblée avec des injections intracérébrales de marqueurs permettant la purification. Le cerveau des souris pourra être prélevé pour purifier les synapses à dopamine.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacer : Pour l'heure, il n'est pas possible de disposer de modèles *in vitro* qui nous permettent d'obtenir des préparations composées uniquement de neurones dopaminergiques dont le recours aux animaux reste nécessaire.

Réduire : Cette étude de 2 ans comportera 90 souris divisées en groupe de 6 animaux. Ce nombre de souris a été choisi suite à des données préliminaires et de la littérature et permet d'obtenir une analyse quantitative suffisante en comparaison statistique. 2 groupes sont prévus pour mettre au point le marquage des synapses, 3 groupes de souris pour la mise au point de la purification, et 10 groupes de souris pour mener à bien l'analyse moléculaire du contenu des synapses dopaminergiques. Pendant la phase de mise au point, 3 groupes de souris seront prélevés sur des animaux de réforme. Le nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des résultats des mises au point. Les résultats de nos analyses.

Raffiner : Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque procédure et d'anesthésie lors des chirurgies, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour le bien-être, les animaux vivent en groupe sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie. Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter toute souffrance prolongée aux animaux avec des mesures de soulagement mises en place (réchauffement et traitements vétérinaires si nécessaires).

12933 L'élasticité est une propriété majeure des grosses artères permettant le lissage du flux sanguin discontinu et pulsatile sortant du cœur, et donc une perfusion continue des tissus. Les fibres élastiques responsables de l'élasticité artérielle sont composées à 90% d'élastine et à 10% de microfibrilles riches en fibrilline-1. Toute perte d'élasticité artérielle due à une dégradation mécanique ou enzymatique des fibres élastiques, a des conséquences délétères majeures sur la

fonction cardiaque, la pression sanguine, l'hémodynamique et la perfusion des organes. Ces altérations des fibres élastiques et dysfonctions associées sont observées dans le vieillissement normal, et dans les maladies génétiques liées à une production ou une organisation anormale des fibres élastiques. Ces situations incluent le syndrome de Williams-Beuren et la sténose aortique supra-valvulaire (qui induisent des rétrécissements ou sténoses artérielles) et le syndrome de Marfan (qui induit des anévrismes). Des études récentes ont également montré que l'altération des fibres élastiques et les dysfonctions artérielles associées peuvent être associées à des conditions pathologiques telles que l'hypoxie intermittente (HI) générée par le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS), qui concerne environ 10% de la population générale et jusqu'à 30-50% des personnes âgées.

Notre projet consiste à introduire, par injection intraveineuse dans la veine caudale de souris présentant des dégradations des fibres élastiques artérielles, une protéine élastique synthétique (SEP, dont la structure et la fonction sont dérivées de celles de l'élastine native) exogène, de vérifier son insertion dans les fibres élastiques dégradées de la paroi des artères, et de restaurer ainsi l'élasticité artérielle, induisant une fonction artérielle et rénale améliorées. Ces expériences seront réalisées chez la souris jeune adulte (6 mois) ou âgé (24 mois) présentant diverses pathologies artérielles et leurs témoins : souris C57Bl6 (animal sauvage) souris modèles du syndrome de Williams-Beuren, (hémizygotés pour le gène de l'élastine, *Eln*^{+/-}), chez les souris adultes modèles du syndrome de Marfan (souris hétérozygotés pour le gène de la fibrilline-1, *Fbn-1* ^{+/-}mgDelta), ainsi que sur des souris adultes soumises à l'hypoxie intermittente, qui mime les effets délétères du SAOS. Dans ce dernier cas, un dispositif présent au laboratoire permettant de maintenir les souris en hypoxie intermittente sera utilisé.

Les résultats obtenus sur ces modèles de souris permettront de vérifier l'efficacité de la SEP dans le maintien ou l'amélioration de l'élasticité artérielle et des paramètres physiologiques associés. et serviront à ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Notre projet inclut la règle des 3R :

Remplacer : la mécanique et la réactivité vasculaires reposent sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires, ainsi qu'une interaction entre les signaux circulants et les différents types cellulaires vasculaires, aussi bien que sur l'interaction entre les différents types de cellules vasculaires structurées de manière très précise dans la paroi, nécessitant forcément une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée.

Réduire : Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats : 10 animaux par groupe sont prévus mais le maximum de procédures expérimentales non-sévères seront réalisées sur tous les animaux, ce qui permet de ne pas devoir recourir à des groupes d'animaux séparés/additionnels pour réaliser des procédures différentes, sauf nécessité absolue due à l'impossibilité de réaliser de multiples études de physiologie sur différents organes vivants en même temps. Après la réalisation des procédures *in vivo* et l'euthanasie des animaux, nous allons collecter les organes et tissus de ces mêmes animaux pour les utiliser au cours des études *ex vivo* et *in vitro* post-mortem, rationalisant encore ainsi le nombre des animaux utilisés. Ce projet de 4 ans concernera 1130 souris, incluant les animaux fournis à notre partenaire.

Raffiner : Outre l'attention générale portée à la qualité des méthodes d'anesthésie et d'analgésie pour tous les animaux, les conditions de l'hébergement de longue durée des animaux en vieillissement, destinés à être utilisés à l'âge de 24 mois, seront particulièrement surveillées afin de limiter au maximum les risques de décès spontané liés à l'âge. Des mesures particulières d'organisation des cages et des animaux dans les cages seront prises. Ce projet étant un travail collaboratif en partenariat avec un autre laboratoire universitaire français, certains animaux seront mis à disposition du laboratoire partenaire qui réalisera l'étude de l'impact de la SEP sur la réactivité vasculaire et sur la fonction rénale. Les souris seront suivies avec un soin particulier avec des points limites clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance. En cas d'atteinte d'un point limite par un animal, celui-ci sera immédiatement euthanasié.

12934 La peau est le plus étendu des organes du corps humain qui assure plusieurs fonctions vitales pour l'organisme. Cet organe est soumis tout au long de la vie à de nombreux dommages, provoqués par des facteurs extérieurs d'origine physique (coupures), mécanique (ulcères), thermique (brûlures) et/ou chimique (radiations). La sévérité des dommages couplés à d'autres facteurs, tels que l'âge, le diabète et la nutrition, peuvent conduire à une mauvaise voire non-cicatrisation des plaies, appelées les plaies chroniques. Elles impactent fortement la qualité de vie des patients, jusqu'à engager leur pronostic vital. Ce problème de santé publique est amené à s'accroître avec le vieillissement de la population et l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité.

Les avancées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la réparation des plaies, ont conduit au développement de biomatériaux implantables basé sur la mise au point de supports tridimensionnels, représentant une des thématiques de notre équipe.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de biomatériaux actifs et d'origine naturelle développés au laboratoire. Ces biomatériaux se présentent sous forme de patch, destinés à délivrer des molécules bioactives qui améliorent le processus de cicatrisation cutanée. Nous souhaitons déterminer le devenir de ces patchs (biocompatibilité, biodégradation, infiltration cellulaire par les cellules de l'hôte, libération des molécules bioactives), ainsi que leurs rôles dans la cicatrisation du derme. Ils seront appliqués directement sur une plaie induite chez la souris. Parmi les modèles de cicatrisation cutanée qu'on retrouve dans la littérature, nous avons retenu celui faisant appel à une biopsie cutanée suivie de la mise en place de disques de silicone permettant d'éviter la rétraction spontanée de la peau. Ce modèle présente l'avantage de refléter au mieux le phénomène de cicatrisation humaine.

Notre projet respecte la règle des 3R :

Remplacer : La cicatrisation est un processus complexe et les méthodes d'analyse *in vitro* ne prennent pas en considération l'environnement local et systémique impliqués dans le processus. De plus, à ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives pour modéliser le développement de plaies cutanées, donc l'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour évaluer l'efficacité de notre dispositif.

Réduire : Pour réaliser cette étude nous avons tenu compte du nombre d'animaux à évaluer de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Le nombre d'animaux utilisés pour la période du projet a été évalué à 320 sur 5 ans.

Raffiner : Une étude de la cicatrisation sera conduite par analyse de la plaie induite chez la souris sur une durée de deux semaines. Les mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours de l'induction du modèle de biopsie cutanée et de l'imagerie. Un suivi du bien-être des animaux sera réalisé par des personnes compétentes au cours de ce projet, par un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours aux analgésiques si nécessaires. Par ailleurs, des points limites ont été définis d'après des grilles d'évaluation basées sur l'état spécifique de la plaie et l'état général de l'animal. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de l'expérience.

12935 Le syndrome des ovaires polykystiques est la cause d'infertilité féminine la plus importante (10% des cas d'infertilité). Cette pathologie se caractérise par des problèmes d'ovulation, des follicules kystiques diagnostiqués par échographie et le plus souvent par un hyper-androgénisme des patientes atteintes (hirsutisme, acné). Au niveau endocrinien, elle se caractérise aussi par des modifications importantes des taux sanguins d'hormones. Principalement considérée comme une pathologie strictement ovarienne, le rôle du système nerveux central dans le syndrome des ovaires polykystiques n'a jamais vraiment été exploré. Le but de ce projet est d'étudier l'implication du système nerveux central dans ce syndrome. Cette étude sera réalisée sur le modèle ovin dont les caractéristiques de reproduction, notamment le taux d'ovulation, sont proches de celle de l'espèce humaine. L'étude des modifications structurales sera réalisée en microscopie électronique et en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Nous comparerons des brebis témoins cycliques avec des brebis présentant le syndrome d'ovaires polykystiques. Ce syndrome sera induit par une exposition des mères à la testostérone au cours de la gestation. Des mâles contrôles ainsi que des mâles issus de ces mères traitées seront également étudiés afin d'analyser les conséquences d'une exposition prénatale à la testostérone. Ce projet a été réfléchi pour respecter la règle des 3R :

Remplacer : nous ne pouvons étudier ce mécanisme physiologique complexe sans recours à l'animal. Pour l'imagerie IRM, nous disposons d'un IRM clinique adapté aux animaux de grande taille qui permettra d'obtenir des résultats plus facilement comparables aux observations réalisées en clinique.

Réduire : L'utilisation de l'imagerie *in vivo* va permettre l'observation de nombreuses structures cérébrales en même temps, sur les mêmes brebis. Cet outil, en plus d'être non invasif, va donc permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés. 70 animaux (50 brebis et 20 béliers) seront étudiés dans ce projet.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables, sur paille et avec du foin de qualité à volonté. Lorsque les animaux seront placés en cases individuelles, ils seront suffisamment proches et auront la possibilité de se sentir et se voir (parois en plexiglas). Ils seront placés sur une litière de paille et disposeront de foin de qualité, comme dans l'hébergement en groupe. Les manipulations des animaux se feront dans le calme. Afin d'éviter tout stress aux animaux, ceux-ci seront anesthésiés durant les sessions d'IRM ; les chirurgies se feront sous anesthésie générale et les animaux recevront des analgésiques dès l'induction de l'anesthésie ; la pose des cathéters veineux se fera également après anesthésie locale afin de limiter la douleur chez l'animal. Des points limites ont été établis : tout animal présentant des signes de repli social, prostration, perte de poids sera soumis à un examen vétérinaire qui décidera du traitement à mettre en place, afin de limiter les souffrances, la décision d'euthanasie pourra être prise en cas d'inefficacité des traitements et avec l'accord du vétérinaire. Concernant les chirurgies, les symptômes de complications sont dépression, abattement, anorexie, prostration en cas d'hémorragie cérébrale (l'animal sera alors euthanasié). Une forte fièvre peut être rencontrée en cas d'infection post opératoire : un traitement antibiotique (Duoprim, 1ml/10kgs) sera instauré avec un antipyrétique (Finadyne, 2ml/50kgs) ; si les symptômes ne rétrocedent pas, les animaux seront alors euthanasiés.

12936 Les enseignements pratiques de physiologie animale et de pharmacologie sont prévus dans le Programme Pédagogique National du DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques, publié en 2013. Ces enseignements sont répartis en 1ère et 2ème année de formation.

La succession des TP permet une maîtrise progressive par l'acquisition de gestes précis indispensables en expérimentation animale. Chaque séance se double d'un aspect théorique et d'un aspect technique avec apprentissage des gestes. Les différents travaux abordés sont la mise en place de cathéters et le suivi pharmacologique d'un médicament en première année de formation. Dans ce cadre, c'est le modèle rat qui est utilisé. En deuxième année de formation, des tests comportementaux et pharmacologiques sont menés chez le modèle souris et rat.

Les différents enseignements pratiques abordés sont les suivants 1) Voies d'accès chez le rat anesthésié, 2) Initiation à la pose de cathéter, 3) Etude de la sécrétion biliaire chez le rat, 4) Screening d'antidépresseurs chez la souris, 6) Absorption intestinale des sucres et régulation de la glycémie chez le rat, 7) Etude de l'intestin isolé de souris, 8) Test d'interaction au pentobarbital chez la souris, 8) Modèle Parkinsonien chez la souris, 9) Tests comportementaux pour criblage de molécules chez la souris.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : l'expérimentation animale ne pouvant pour l'heure être remplacé totalement par des approches alternatives il est indispensable que les utilisateurs soient formés correctement aux bonnes pratiques expérimentales.

Réduire : Le nombre minimum d'animaux seront utilisés, ainsi un total de 161 rats mâles Wistar et 860 souris mâles Swiss est utilisé chaque année pour la formation de 154 étudiants soit un total de 805 rats et 4300 souris pour la durée totale du projet de 5 ans.

Raffiner : Les enseignements pratiques utilisant le modèle rat sont réalisés sous anesthésie générale et une surveillance continue est réalisée afin de s'assurer en permanence de l'absence de signes de réveil. En cas de signe de réveil, une nouvelle dose (de moitié) d'anesthésique sera administrée. Au cours des expérimentations menées sur le modèle souris, les tests comportementaux effectués n'induisent pas de douleur. Néanmoins l'expérimentateur restera vigilant quant à tout signe éventuel de stress, en surveillant la respiration ou d'éventuels signes d'isolement vis à vis de ses congénères. A l'issue de chaque séance de travaux pratiques, les animaux sont mis à mort selon la réglementation en vigueur, soit par injection d'une solution euthanasiante (rats) soit par dislocation cervicale ou administration progressive de CO₂ (souris).

Les animaux sont hébergés dans une animalerie contrôlée (température, ventilation, hygrométrie, photopériode) et dans le respect de la méthode des 3R, avec un enrichissement adapté à chaque espèce animale. Le milieu sera enrichi en objets modifiables permettant aux animaux de créer un environnement propice à leur développement et à leur épanouissement. Les soins sont apportés par du personnel qualifié (concepteur et applicateur des procédures expérimentales), dans le respect du bien-être animal. La nourriture est en quantité suffisante pour que les animaux aient un accès à volonté. Les cages utilisées (en plexiglas et munies d'une grille dans sa partie supérieure) permettent une disponibilité à volonté des aliments (bouchons) et de l'eau de boisson.

12937 Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus* - SA) est l'espèce de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Cette bactérie est responsable d'un large éventail d'infections cliniques telles que des pneumopathies, des endocardites, des infections ostéoarticulaires, ainsi que des infections de la peau et des tissus mous (IPTMs). Son importance a explosé au cours des 20 dernières années avec l'émergence d'une épidémie mondiale d'IPTMs issues de souches de SA résistantes à un antibiotique, la méticilline (MRSA). Également, ces souches sont fréquemment résistantes à d'autres lignes antibiotiques et produisent de nombreuses toxines. Le développement de nouvelles alternatives dans le traitement des infections cutanées à SA est donc nécessaire. Enfin, la mise au point de modèles d'infection précliniques adaptés est également requise pour l'évaluation ultérieure de ces nouvelles thérapies.

Ce projet vise donc à développer un modèle stable d'infection cutanée à SA chez le lapin afin d'apporter un support robuste permettant l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies anti-SA. Une étude pilote, nous a permis d'appréhender la variabilité de ce modèle (dépendante du site d'infection et de la quantité de bactéries utilisée) et d'ajuster au mieux les paramètres d'anesthésie et d'analgésie afin d'améliorer le bien-être animal.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : Le développement d'une infection cutanée engendre une cascade de réactions physiologiques impliquant différents organes immunitaires ce qui rend le remplacement du modèle animal difficile. Également, les cellules immunitaires du lapin sont davantage semblables à celles de l'homme que ne le sont celles de la souris dans les infections à SA.

Réduire : L'effort de réduction repose sur une stratégie d'expérimentation progressive nécessitant seulement 4 lapins par expérience dont les résultats permettront l'amélioration du mode opératoire de l'expérience suivante. Les principaux paramètres pouvant varier sont la quantité de bactéries ainsi que la présence ou non d'un booster de toxine dans l'inoculum (supplémentation ou non d'acide pyruvique lors de la culture bactérienne). Le nombre maximum d'animaux pour cette étude est estimé à 24.

Raffiner : Les conditions d'hébergement sont optimisées par l'enrichissement du milieu. Un suivi biquotidien est également mis en place afin d'évaluer et de réduire au mieux la douleur de l'animal grâce à l'utilisation d'analgésique. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12938 L'infection avec des vers intestinaux est souvent caractérisée par un état d'immunosuppression de l'hôte. Cette immunosuppression est induite par le parasite qui en bénéficie pour persister au sein de l'hôte. Il est cependant de plus en plus admis que la modulation de la réponse immunitaire peut également produire des bénéfices pour l'hôte, en termes de traitement de certaines maladies inflammatoires. Les télomères sont des séquences d'ADN qui se trouvent au bout des chromosomes et qui ont la fonction de les protéger durant les divisions cellulaires. Avec le temps, la longueur de ces séquences d'ADN se réduit ce qui accélère le vieillissement cellulaire. Un état pro-inflammatoire peut accentuer l'érosion des télomères et ainsi accélérer le processus de vieillissement. Ce projet vise à étudier le rôle possible de la modulation de la réponse inflammatoire induite par un nématode intestinal dans l'érosion des télomères chez la souris.

Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Etant donné que l'objectif est d'étudier l'effet de la modulation de la réponse inflammatoire induite par le nématode sur un marqueur de vieillissement, il n'est pas possible de substituer l'approche *in vivo* par une approche *ex vivo*.

Réduire : Cependant, le nombre d'animaux requis est réduit au minimum et un total de 100 souris sera utilisé sur une période de 5 ans.

Raffiner : Il est important de rappeler que l'infection par le nématode est asymptomatique, n'affectant pas l'état de santé des souris, le bien-être des animaux sera respecté en les hébergeant en groupe (5 ou 8 souris par cage) ce qui est important pour une espèce sociale et en enrichissant le milieu de la cage. Même si, comme évoqué précédemment, l'infection est totalement bénigne, les souris seront surveillées et en cas d'altération de leur état de santé, elles seront immédiatement sorties de l'étude.

12939 La mesure de la pression artérielle pour le test de substances, ou l'étude des paramètres cardiovasculaires, etc., ne peut se faire que sur un animal entier (pas de remplacement possible) – il est nécessaire de s'entraîner pour le faire correctement – or, la télémétrie permet de respecter les règles de raffinement et de réduction car elle est la seule méthode permettant d'enregistrer pendant une longue durée la pression artérielle de souris vigiles. L'utilisation de plus en plus courante de cette méthode permet

(1) d'enregistrer des chiffres tensionnels plus bas et plus représentatifs de la vie de l'animal que les méthodes plus anciennes (traduisant son absence d'impact sur le bien-être animal), car elle peut être utilisée en continu, dans les conditions optimales de vie et de stabulation, pendant plusieurs jours, sans confinement ni contrainte (raffinement),

(2) d'acquérir les signaux et les valeurs de pression artérielle en condition de base et/ou sous administration de substances par exemple, chaque animal étant son propre témoin, donc (3) de réduire le nombre total d'animaux utilisés pour les futurs projets, en ménageant une période de repos entre chaque phase test.

Pour acquérir les signaux de pression artérielle par télémétrie chez la souris, il faut au préalable poser en artère carotide sous anesthésie gazeuse et chirurgie aseptique, l'extrémité micro-cathéter d'un capteur transformant les ondes de pression en ondes radiophoniques (il suffira ensuite de glisser une plaque réceptrice sous la cage de stabulation). Après chirurgie, l'animal reste au repos à l'animalerie pour récupération pendant 2 semaines minimum avant toute manipulation.

La miniaturisation et la précision de l'approche chirurgicale chez la souris (précision au millimètre des mesures des repères anatomiques) nécessitent que les compétences acquises soient entretenues régulièrement, afin de pouvoir les décliner lors de demandes de futurs utilisateurs. Par exemple, pour chaque souche, genre, âge de souris, les repères anatomiques, déterminant les longueurs de cathéter à implanter, peuvent changer et nécessitent d'être vérifiés avant les projets scientifiques utilisant la télémétrie. Aussi, un entraînement minimum d'1 fois par an sur 3 à 5 souris permettra d'optimiser les gestes et de réduire le nombre de souris à utiliser au préalable des futurs projets des laboratoires utilisateurs pour les mesures anatomiques. Le nombre total de souris utilisé dans le présent projet sera donc de 25. Ces entraînements et repérages seront réalisés dans les mêmes conditions et selon la même procédure (anesthésie isoflurane, chirurgie aseptique sous

maintien à 37°C pour pose du micro-cathéter en artère carotide et positionnement de l'implant dans une poche sous-cutanée sur le flanc de l'animal, réhydratation par administration de liquide physiologique dans la poche sous-cutanée, antalgie, suivi de la récupération post-opératoire) que celles des futurs projets, mais en utilisant des implants de télémétrie factices fournis en conditionnement stérile.

Les animaux seront hébergés pendant 2 semaines pour vérifier la bonne récupération post-chirurgicale, témoignant de la bonne réalisation des gestes par l'expérimentateur, puis le positionnement précis de l'extrémité du micro-cathéter (1 mm dans l'aorte ascendante) sera vérifié post-mortem (1 mm dans l'aorte ascendante, ce qui permet de confirmer la longueur insérée in situ à partir du repère anatomique bifurcation artère carotide interne/externe) et le capteur récupéré pour une stérilisation et implantation future.

Les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées, à 5 souris par cage, dans des cages de 500 cm². Notamment, nous veillerons à l'enrichissement du milieu de vie (tunnels de polycarbonate, buchettes en peuplier). Un hébergement en cage individuelle pendant les 3 premiers jours post-opératoires sera mis en place pour permettre un suivi rapproché et éviter les altérations des cicatrices par les congénères.

Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt : perte de poids de 20% sur une semaine, sans reprise de poids après le 3^e jour post-chirurgie, poils hérissés, difficultés à s'alimenter ou boire (suivi des contenus mangeoires et biberons), et toute anomalie de comportement telle que prostration, alors la mise à mort par injection d'euthanasiant sous anesthésie gazeuse des animaux sera décidée. Si un retard de cicatrisation, ou grattage de la plaie ou de la poche sous cutanée, sont constatés, une ré-anesthésie gazeuse pour une exploration, un nettoyage, une désinfection locale de la plaie sera faite. Si cet état persiste, la mise à mort des animaux sera décidée.

12940 Nos projets visent à étudier l'efficacité de la combinaison de nouveaux traitements anticancéreux dans les cancers du rein qui présentent soit une insensibilité soit ayant acquis des résistances aux thérapies conventionnelles et indiqués dans ces cancers.

La principale caractéristique des cancers du rein est leur hyper vascularisation qui s'explique par la surexpression du VEGFA, un facteur pro-angiogénique liée à l'inactivation du gène Von Hippel Lindau. Le traitement de référence des cancers du rein est le sunitinib, un anti-angiogénique qui bloque le développement des vaisseaux sanguins.

Comme dans de nombreux autres cancers, l'immunothérapie a révolutionné la prise en charge des cancers du rein. Néanmoins, seulement 40% des patients bénéficient de l'immunothérapie. Il semble donc nécessaire de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques en combinant l'immunothérapie à d'autres molécules favorisant celle-ci.

Ce projet a pour but de confirmer que l'inhibition de la protéine EZH2, ainsi que l'immunothérapie anti-PD1 induisent une régression tumorale. Nous évaluerons également le potentiel additif de ces traitements, et comparerons leur efficacité au traitement de référence, le sunitinib.

Ces expériences ont pour objectif de proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancers du rein résistants aux traitements de référence, le sunitinib.

Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point *in vitro* nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences *in vivo*. En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études *in vivo* sont nécessaires et incontournables.

Réduire : Nous utiliserons pour ce projet un total de 100 souris. Ces souris sont immunocompétentes ce qui permet de réaliser ces études dans un modèle murin avec un système immunitaire intacte.

Raffiner : De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, un enrichissement du milieu (maison), par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite à l'injection des cellules en sous cutanée mais aussi suite à l'administration des différents traitements. Aucun effet néfaste des composés n'est attendu étant donné les données de la bibliographie mais aussi par le fait que ces 3 traitements sont des médicaments utilisés en clinique.

12941 Le sujet de recherche de notre équipe est focalisé sur l'étude de la physiopathologie des maladies neurodéveloppementales humaines d'origine génétique. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les rôles de mutations génétiques identifiées dans des malformations corticales chez l'homme et améliorer la compréhension des mécanismes sous tendant l'apparition de ces maladies. A ce jour, aucun modèle d'expérimentation *in vitro* ne peut mimer ou refléter toute la complexité des différents stades (prolifération, migration et différenciation des neurones) qui ont lieu dans le cerveau pendant sa période de maturation. L'électroporation *in utero* est une approche génétique qui permet de tester les effets induits par un gène d'intérêt dans le système nerveux central d'embryons de souris gestantes anesthésiées. Cette technique nous a permis d'identifier des anomalies lors des stades de maturation cérébrale.

Nous avons poursuivi nos travaux en étudiant les effets des mutations dans un contexte plus physiologique. L'étude du modèle murin a permis de confirmer, à l'âge adulte, la présence d'anomalies morphologique identifiées lors du développement cortical. Nous avons étudié les conséquences de ces mutations sur le comportement et la susceptibilité à l'épilepsie. Cela a permis de mieux comprendre le lien entre les anomalies cellulaires identifiées chez la souris et le phénotype observé chez les patients présentant une déficience intellectuelle et de l'épilepsie.

Dans la suite de ce projet, nous souhaitons poursuivre des explorations permettant d'approfondir la question du lien entre ces anomalies morphologiques et le phénotype clinique. Pour ce faire, nous allons générer une souris transgénique pour une Cre recombinase inducible par des injections de Tamoxifène. Ce modèle nous permettra de disposer d'un contrôle tardif de l'expression de la mutation en l'activant en période postnatale, pour éviter d'interférer avec les mécanismes complexes qui se déroulent pendant la période de développement du cerveau. Cette induction tardive nous permettra de vérifier si des anomalies corticales sont observables et si tel est le cas, elles seront liées directement à la mutation et non aux conditions physiologiques de la période développementale.

Nous réaliserons une étude anatomique du cortex, des tests comportementaux et la susceptibilité à l'épilepsie. Nous vérifierons si les souris présentent de l'épilepsie et si tel est le cas si cette épilepsie est de type généralisée et myoclonique comme celle observée chez l'homme.

Le projet respecte la règle des 3R.

Remplacer : Cette expérimentation animale ne peut être recréée par des approches *in vitro*.

Réduire : Le nombre total d'animaux utilisé dans ce projet est estimé à 40 souris au total (20 souris contrôle et 20 souris mutés). Pour réduire le nombre d'animaux, les mêmes animaux seront utilisés pour réaliser les tests comportementaux et tester la susceptibilité à l'épilepsie.

Raffiner : Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. La reproduction et l'élevage de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Nous limiterons le temps de manipulation à 45 minutes sur animal anesthésié. Après la chirurgie, l'animal est placé dans une cage chauffée à 35° et est surveillé jusqu'au réveil complet et pour gérer toute éventuelle complication. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien (Métacam) est ajouté à l'eau du biberon pendant 2 jours après la chirurgie. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse. En cas de complication importante ou de douleur manifeste, les animaux sont euthanasiés immédiatement.

12942 Le projet de recherche présenté ci-dessous vise à évaluer les effets protecteurs d'un composé pharmaceutique sur les hémorragies intracérébrales spontanées (HICS).

Chez l'Homme, l'HICS, non traumatique, résulte d'une irruption importante de sang dans le parenchyme cérébral, suite à une rupture de micro-vaisseaux. Aujourd'hui, il n'existe aucune stratégie thérapeutique pharmacologique permettant de réduire les effets délétères d'un hématome sur le parenchyme cérébral. L'objectif de ce projet est de tester un candidat thérapeutique dans deux modèles complémentaires d'hémorragies intracérébrales chez le rat, qui caractérisent deux phases différentes de la pathologie. Un modèle d'hémorragie cérébrale induite par injection de collagénase, et un second modèle obtenu par injection de sang hétérologue. Ces 2 modèles permettent de distinguer les effets propres du sang sur le reste du parenchyme cérébral de l'effet de masse lié au saignement.

L'étude de ce composé pharmaceutique sera réalisée en 3 phases distinctes chez le rat Sprague Dawley male de 7 à 8 semaine. Le rat semble l'espèce la plus adaptée pour cette étude du fait que ces modèles aient été mis au point et caractérisés dans cette espèce.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R.

Remplacer : Notre projet correspond à l'étape de validation *in vivo* de notre stratégie thérapeutique, qui fait suite aux validations réalisées *in vitro*, et ne nous permet donc pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal.

Réduire : De plus, l'association d'une étude de puissance statistique basée sur la littérature ainsi que l'utilisation de techniques d'évaluation non invasives comme l'IRM permettront de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=267 pour les 3 phases de l'étude).

Raffiner : Toutes les procédures seront organisées afin de réduire l'inconfort et le stress liés à la manipulation de l'animal. Toutes les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique pour limiter au maximum les sensations de douleur. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt.

12943 Bien que la spiruline soit couramment utilisée par les athlètes humains pour ses propriétés anti-oxydantes qui ont des répercussions bénéfiques sur les performances sportives, elle est encore peu utilisée en alimentation équine. Ceci peut être dû en partie au manque de connaissances scientifiques sur les effets bénéfiques potentiels de la spiruline chez le cheval spécifiquement. Le présent projet vise à mener une étude pour déterminer l'effet de la spiruline sur la performance sportive du cheval et sur son microbiote fécal.

Les chevaux inclus dans l'étude sont 9 hongres Trotteur Français adultes répartis en trois groupes de trois individus afin de tester une ration témoin versus la même ration supplémentée avec de la spiruline intégrale ou un extrait de spiruline. Les chevaux reçoivent donc à tour de rôle trois régimes différents. L'étude est composée de trois périodes de 6 semaines. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque cheval est son propre témoin puisque chaque lot teste les trois régimes dans un ordre différent. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique nécessaire à l'étude. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement.

L'évaluation de l'effet des deux produits sur les paramètres du microbiote fécal consiste en une fouille rectale le 28ème jour de chaque période. Il y a donc trois fouilles séparées de 6 semaines sur la durée totale de l'essai.

Afin d'évaluer les capacités sportives et de récupération des chevaux, à la fin de chaque période, ils réalisent trois tests montés différents. Durant ces tests les paramètres cardio-respiratoires sont mesurés grâce à un cardiofréquence-mètre et un système de mesure des échanges gazeux portable. De plus, pour les deux derniers tests, des prises de sang sont réalisées pour suivre l'évolution de la lactatémie des chevaux avant l'effort et dans les quinze minutes après l'exercice. Pour l'évaluation de ce paramètre, trois gouttes de sang sont suffisantes. Enfin, pour le dernier test une prise de sang est réalisée 24h et une autre 48h après le test pour la mesure de marqueurs de dommages musculaires et du statut antioxydant. Il y a donc une douzaine de prise de sang par cheval à la fin de chaque période.

Cette étude répond à la règle des 3 R.

Remplacer : Il n'existe pas d'autres modèles pour étudier la spiruline sur la performance des chevaux comme par exemple les paramètres cardio-respiratoires. L'utilisation des animaux est donc nécessaire.

Réduire : Pour observer des différences statistiquement significatives entre les 3 traitements, il faut 9 chevaux.

Raffiner : Pendant toute la durée de l'essai, les chevaux vont au paddock en groupe et sont exercés quotidiennement soit monté soit au marcheur. Ceci permet de respecter leur bien-être. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation. Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

12944 Depuis les années 1990, la protéine Tau a été identifiée comme étant un acteur important d'une famille de pathologies neurodégénératives aujourd'hui appelées tauopathies incluant notamment la maladie d'Alzheimer (MA), mais également des pathologies plus rares comme la maladie de Pick, certains syndromes parkinsoniens (syndrome de l'île de Guam) ou encore la dystrophie myotonique de Steinert.

La protéine Tau est une protéine de structure des neurones, qui dans un processus pathologique change de configuration et forme des agrégats de protéines perturbant ainsi le fonctionnement des neurones conduisant à leur mort.

Dans le cas de la MA, cet événement entraîne des troubles de l'apprentissage et de la mémoire, mais affecte également d'autres fonctions telles que le langage, la reconnaissance des éléments de l'environnement et les fonctions motrices.

Actuellement pour la MA, seuls des traitements à visée symptomatique sont disponibles ; ils ne traitent pas la maladie mais masquent certains déficits comportementaux. La modulation des effets neurotoxiques de la protéine Tau est une cible thérapeutique clé pour retarder l'évolution de la MA. Il est clairement établi que les protéines Tau anormalement agrégées perturbent le fonctionnement neuronal menant à l'altération des performances cognitives. Différentes stratégies thérapeutiques ciblant les protéines Tau sont étudiées dans le but d'enrayer la neurodégénérescence associée à la MA.

Le développement d'outils permettant l'évaluation de molécules pouvant avoir un effet sur la neurotoxicité de la protéine Tau reste un défi majeur des programmes de recherche visant à lutter contre la MA. La mise en place d'un modèle de MA induit par l'injection intracérébrale de protéines Tau capables de s'agréger, représente un bon outil pour le screening de produits à visée thérapeutique dans la MA. En effet, ce modèle se caractérise par des altérations synaptiques associées à des troubles mnésiques et cible l'hippocampe et le cortex entorhinal, structures directement impliquées dans les fonctions cognitives et les troubles mnésiques observés chez les patients atteints de la MA.

Notre projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de 60 produits sur les altérations comportementales et tissulaires induites par l'administration intracérébrale de Tau chez la souris (procédure 1). L'administration des produits testés sera effectuée soit par voie intranasale, soit par voie intrapéritonéale, soit par voie orale (procédure 2), selon le type de produit et la cible thérapeutique. Pour évaluer les effets mnésiques des produits, après l'administration de Tau, les animaux réaliseront des tests mesurant leurs performances de mémoire grâce à différents paradigmes comportementaux : le test du labyrinthe en Y (mémoire spatiale à moyen terme) (procédure 3), le test de reconnaissance d'objet (mémoire à court et moyen terme) (procédure 4), le test de déplacement d'objet (procédure 5), le test de coordination sensorimotrice (procédure 6) et le test de la piscine de Morris (mémoire spatiale à long terme) (procédure 7).

Cette étude répond à la règle des 3 R.

Remplacer : La modélisation de la MA à ce niveau complexe d'intégration ne peut à l'heure actuelle être modélisé *in vitro* ou *in silico* ;

Réduire : Dans notre projet, nous veillerons à pouvoir réduire au maximum les animaux tout en gardant une bonne sensibilité statistique si cela est possible. Au maximum 1560 souris mâles C57BL6J âgées de 11 semaines à leur arrivée seront utilisées dans ce projet, sur 5 ans

Raffiner : Les animaux seront hébergés à 3 par cage, en présence d'enrichissement du milieu, en cycle de lumière inversé, pour observer leur comportement à la suite des traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie). Un soin particulier sera apporté à la prise en charge de la douleur : au cours de l'opération chirurgicale par une anesthésie générale à l'aide d'un gaz anesthésique (Isoflurane) et en post opératoire par l'administration d'un antidouleur morphinique (buprénorphine)

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et en cas d'atteinte d'un des points limites fixés (perte de poids, agressivité, cachexie, vocalises, infection post-opératoire), ils seront mis à mort dans des conditions éthiques. Nous veillerons à la réduction de facteurs environnementaux induisant des variabilités dans les résultats pour assurer une très bonne reproductibilité des expériences (réduction du stress, prise en charge de la douleur post-opératoire).

12945 La sclérose en plaques est une maladie invalidante touchant le système nerveux central, caractérisée par une démyélination, une inflammation et une dérégulation immune. Cette pathologie est médiée par des lymphocytes T présentant une auto réactivité contre les protéines de la myéline et par l'activation de cellules B produisant des anticorps autoréactifs. Cette perte de tolérance au soi accompagnée d'un défaut et d'une dysfonction des cellules T régulatrices, et d'une résistance des cellules T effectrices à la suppression, entraînent un déséquilibre immun responsable de la pathogénèse de la sclérose en plaques.

L'objectif de ce projet est de premièrement évaluer le rôle de l'IL-34 (Interleukine-34) dans le développement de l'encéphalomyélite immune expérimentale (EAE) induite par la glycoprotéine MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) chez la souris C57Bl/6, modèle préclinique de sclérose en plaques le mieux caractérisé. Et dans un second temps, évaluer le potentiel thérapeutique d'une surexpression de l'IL-34 dans ce modèle d'EAE.

Des études menées par notre équipe ont mis en évidence que l'IL-34 est une cytokine exprimée par les T régulatrices CD4+ et CD8+ et permet d'induire une tolérance à l'allogreffe. De plus, cette cytokine régulatrice est aussi nécessaire au recrutement et développement de la microglie: le système immunitaire du système nerveux central. L'hypothèse suggérée est que l'IL-34 agit en recrutant/augmentant la microglie, le système immunitaire du SNC, offrant une protection en diminuant l'inflammation. Son absence induirait un développement de la maladie plus précoce et au contraire sa surexpression serait protectrice.

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

Remplacer : A ce jour, aucune expérience *in vitro* ou modélisation informatique ne permet de rendre compte d'une maladie auto-immune telle que la sclérose en plaques.

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre d'animaux nécessaires aux deux objectifs sera de 40. Le modèle murin d'EAE induite par le MOG étant précédemment mis au point par le laboratoire et donc opérationnel.

Raffiner : Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de l'EAE. Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant une paralysie sévère. Tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans la moelle épinière, et par immunohistologie pour étudier l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

12946 L'athérosclérose est une pathologie largement répandue dans les pays développés. Elle se caractérise par le développement de plaques composées de corps gras au niveau de la paroi interne des artères. Ce dépôt constitue alors l'athérome qui pourra progressivement boucher les vaisseaux. Une des complications difficilement prévisibles de cette pathologie est la rupture de plaque (la plaque se casse et des morceaux se détachent) pouvant engendrer une brusque oblitération totale d'un vaisseau et des dégâts irréversibles en empêchant la libre circulation sanguine. L'identification des plaques « fragiles » n'est pas aujourd'hui possible en clinique, il est donc impossible de prévoir ni de stratifier le risque de rupture de plaque. Nous proposons dans notre projet de développer des marqueurs d'imagerie de plaque fragile pouvant être à terme utilisés dans le diagnostic chez l'homme. Pour cela nous avons identifié des marqueurs précoces de fragilité sur la base d'études passées pour en faire des traceurs d'imagerie. Après cette étape, il est important de vérifier que ces traceurs sont utilisables, détectables en imagerie et qu'ils vont bien se fixer à la plaque.

Pour cela nous commencerons par vérifier que ces traceurs sont bien éliminés de l'organisme et qu'ils ne s'accumulent pas dans un organe en particulier sur des souris saines (biodistribution). Puis, nous travaillerons sur un modèle de souris qui développe des plaques d'athérome, les souris LDLr KO et nous évaluerons la fixation de nos nouveaux traceurs d'imagerie sur les plaques d'athérome en travaillant avec des caméras utilisées en routine clinique (Scintigraphie, scanner, IRM, PET) mais adaptées au petit animal.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour ce projet visant à étudier le trajet dans l'organisme d'une molécule administrée par voie veineuse.

Réduire : Tout d'abord, en comparaison avec une étude de biodistribution classique qui nécessite la mise à mort des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps chez le même animal et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. Pour évaluer 8 nouveaux traceurs et au final sélectionner le plus performant nous estimons nos besoins à 240 souris saines et 288 souris porteuses de plaques soit un total de 528 souris.

Raffiner L'étude préalable des molécules d'intérêt sur culture cellulaire permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée et participe au raffinement de l'étude. Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injection intraveineuse, prélèvements sanguins et imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante pour réduire l'inconfort potentiel à son minimum.

12947 Le système immunitaire est activé en cas d'infection par les bactéries et les virus mais également au cours du développement de cancer. Plusieurs études se sont déjà attachées à identifier le rôle des différents globules blancs au cours d'un cancer et d'autres études ont montré que la chimiothérapie pouvait moduler les proportions des différentes populations de globules blancs. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe montrent que le Cisplatine (une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du poumon) recrute des populations particulières de globules blancs, appelés lymphocytes. Les données de la littérature indiquent que ces lymphocytes sont essentiels dans la réponse immunitaire contre la tumeur. Les autres chimiothérapies à base de sel de platine, l'oxaliplatine et le carboplatine ont été décrites comme pouvant également solliciter le système immunitaire dans la tumeur. Cependant, l'importance de ces réponses immunitaires par rapport à la cytotoxicité directe de ces chimiothérapies contre la tumeur reste à déterminer. C'est pourquoi nous souhaiterions étudier l'efficacité de ces chimiothérapies dans des souris immunocompétentes et des souris ne possédant pas de lymphocytes.

Nous effectuerons des suivis de croissance tumorales dans des souris sauvages ou ne possédant pas de lymphocytes porteuses de tumeur et traitées par cisplatine, oxaliplatine ou carboplatine. L'ajout d'un inhibiteur (la digoxine) d'un certain type de globule blanc (les cellules lymphoïdes innées) sera également utilisé afin de déterminer si ce globule blanc participe à l'efficacité contre la tumeur de ces chimiothérapies. Ainsi, des souris C57Bl6 ou nude (ne possédant pas de lymphocytes) recevront une injection de cellules tumorales dans la patte. Dix jours après l'injection, lorsque la tumeur est mesurable, les souris seront traitées avec 6 mg/kg de Cisplatine ou 12 mg/kg

d'Oxaliplatine ou 80mg/kg de carboplatine en association ou non avec de la digoxine, un groupe contrôle recevra une solution saline de PBS. Les tumeurs de ces souris seront mesurées trois fois par semaines dès l'injection des cellules tumorales.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R.

Remplacer : Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux.

Réduire : Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que trois fois en regroupant tous les différents groupes, ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux contrôle et donc le nombre total d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Cette étude nécessitera 120 souris C57Bl6 et 120 souris Nude.

Raffiner : La totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs et sacrifice) seront réalisées sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt afin d'éviter toute souffrance.

12948 Dans le cerveau, certaines altérations du métabolisme énergétique sont une manifestation précoce des maladies neurodégénératives, en particulier de la maladie d'Alzheimer. Compte tenu du nombre de personnes âgées souffrant de ce type de maladies et de l'absence de biomarqueurs précoces en imagerie, la capacité d'évaluer et quantifier ces altérations de manière non-invasive serait d'un énorme intérêt. Cela permettrait notamment de diagnostiquer plus tôt le déclenchement de la maladie ou de suivre de manière très fine son évolution.

Il n'existe pour le moment aucun traitement permettant de ralentir l'évolution de la maladie d'Alzheimer. Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués permettrait de trouver des biomarqueurs précoces détectables en neuroimagerie, donc de manière non-invasive. Les défauts énergétiques pourraient constituer un biomarqueur extrêmement informatif sur le stade de la maladie et sa progression. Cependant, les outils actuels pour de telles mesures sont très limités et n'offrent qu'une vision parcellaire et figée du métabolisme énergétique *in vivo*.

L'objectif de ce projet est de développer et valider de nouvelles méthodes d'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM, Imagerie par Résonance Magnétique) afin d'accéder à des mesures dynamiques et plus représentatives du métabolisme énergétique cérébral. Il s'agit en l'occurrence de pouvoir imager et suivre de façon non invasive et avec une très bonne résolution spatiale l'utilisation du glucose, principale source d'énergie, par les cellules du cerveau. Pour cela, le substrat énergétique sera injecté par voie intraveineuse à des modèles rongeurs (souris et rats). Le recours au rat permettra de mettre au point la méthode proposée qui nécessite des prélèvements sanguins dans l'IRM. La méthode sera ensuite transférée chez la souris (les prélèvements sanguins dans l'IRM y étant impossibles en raison du faible volume sanguin total) puis utilisée pour étudier les défauts du métabolisme énergétique dans un modèle souris de la maladie d'Alzheimer. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, sont nés et élevés en captivité. Ils proviennent d'un élevage autorisé (rats et souris de souche sauvage) ainsi que d'une colonie de souris modèle de la maladie d'Alzheimer établie au sein de notre laboratoire.

Respect de la règle des 3R : Remplacer Le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet car aucun milieu de culture ou simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du métabolisme énergétique du cerveau. Les modèles rongeurs sont pertinents pour l'étude de la Maladie d'Alzheimer car il existe déjà de nombreux modèles de cette maladie. De plus, leur petite taille permet d'étudier précisément le métabolisme énergétique du cerveau par IRM dans des scanners à haute performance (IRM très hauts champs).

Réduire : Le projet prévoit l'utilisation d'un total de 20 rats de souche sauvage, 50 souris de souche sauvage et 20 souris 3xTg. Ce nombre maximum a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et des différents groupes expérimentaux requis pour pouvoir répondre à notre question scientifique.

Raffiner : Les examens IRM sont effectués sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés au système de positionnement de l'animal qui diminuerait le bien-être des animaux. La pose du cathéter veineux ainsi que l'injection du substrat énergétique seront faites sous anesthésie générale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'examen ainsi que durant la phase de réveil. Le suivi quotidien et l'application de critères d'arrêt de l'expérience sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus qui compromettraient le bien-être des animaux.

12949 L'objectif de ce projet s'inscrit dans la recherche de stratégies thérapeutiques pour traiter une maladie génétique rare du muscle pour lesquelles il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement. Les dystrophies musculaires sont des maladies génétiques conduisant à une atrophie et faiblesse des muscles squelettiques conduisant à la perte progressive des fonctions motrices. Des déficits de régénération musculaire ont été précédemment observés dans un modèle d'une dystrophie musculaire dans un contexte de régénération tissulaire accélérée du muscle en comparaison avec des souris sauvages. Cette régénération est obtenue suite à l'utilisation d'un traitement biochimique qui force le muscle à se régénérer. Le but de ce projet est d'évaluer l'effet thérapeutique de différents traitements de thérapie génique par rapport au critère de régénération dans le modèle de dystrophie musculaire. En effet, les critères d'évaluation d'efficacité thérapeutique pour cette maladie sont très peu nombreux. De plus, les modèles animaux ont un phénotype très tardif. L'observation d'un déficit de régénération peut donc être un critère pouvant permettre de définir avec précision et précocité l'efficacité d'un traitement.

Ce projet comporte 2 étapes. La première permettra de définir parmi les modèles disponibles celui présentant le plus de différence avec des souris sauvages et la deuxième étape permettra d'évaluer la correction du critère de régénération dans le modèle le plus sévère après traitement par transfert de gène. Dans les 2 cas, la régénération est consécutive à une injection intramusculaire dans un seul muscle par une toxine de serpent qui va détruire les membranes des fibres musculaires. La régénération qui s'en suit est totale au bout de 15 à 21 jours.

Règle des 3R :

Remplacer: Les études de régénération du muscle ne peuvent se faire qu'*in vivo* à ce jour car il n'existe pas de modèle *in vitro* combinant les différents types cellulaires impliquées, ce qui ne permet pas de remplacer.

Réduire : Dans un effort de réduction, la procédure 1 permettra de définir parmi les 5 modèles possibles le modèle le plus adapté à l'évaluation des critères de régénération. Seul ce modèle sera utilisé dans les procédures suivantes. Les muscles controlatéraux serviront de contrôles, évitant le recours à des groupes d'animaux contrôles supplémentaires. Le groupe d'animaux de la procédure 1 correspondant au modèle le plus différent des souris sauvages servira de contrôle avec notexine et sans traitement de thérapie génique dans la procédure 2. Dans ce projet, nous estimons que 62 animaux seront utilisés. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats.

Raffiner: Des mesures supplémentaires seront prises dans les procédures expérimentales (utilisation de plaque thermostatée pour maintenir la température corporelle stable ; de gel oculaire pour éviter le dessèchement des tissus lors des anesthésies...). L'environnement sera enrichi par l'ajout d'éléments (igloos, Aspen bricks, roues). Des mesures adaptées seront également prises afin de réduire le stress, et la douleur chez les animaux (analgésies et anesthésies adéquates). L'injection de toxine est précédée par une injection préventive d'antalgique. Les animaux seront particulièrement suivis dans les heures et les jours suivant le traitement biochimique.

12950 En 1999, le Comité Permanent de la Convention Européenne pour la protection des animaux dans les élevages a recommandé que des études portant sur des méthodes alternatives au gavage chez les palmipèdes soient mises en place dans les pays producteurs de foie gras (articles 24 et 25).

Les travaux conduits chez l'oie depuis plusieurs années ont consisté à exploiter le comportement d'hyperphagie (une forte augmentation de la consommation alimentaire) observé à l'état naturel chez les oiseaux durant la période pré-migratoire pour constituer les réserves énergétiques nécessaires aux longs vols migratoires. Ces travaux ont permis de montrer que la distribution de maïs sec à volonté (séquence dite de "relâchement") durant la période hivernale et après une phase de restriction alimentaire (qui permet néanmoins de couvrir les besoins d'entretien) combinée à une réduction de la durée d'éclaircissement permettait l'expression d'un comportement hyperphagique transitoire chez l'oie, associé à un engraissement spontané très variable du foie. Nous avons également montré que la grande diversité de poids de foie obtenue par cette méthode était fortement liée aux différences de consommation de maïs observées entre les animaux : tous les animaux ne montrent pas une même intensité de surconsommation alimentaire.

OBJECTIFS :

L'objectif de ce projet est l'analyse génétique des comportements alimentaires des oies avant et pendant la distribution de maïs, en relation avec la grande variabilité observée sur la capacité d'engraissement des foies. Pour cela on cherchera à estimer la part de variabilité observée imputable à la génétique (héritabilité) sur la production de foie et les quantités ingérées, ainsi que les corrélations génétiques entre les différents caractères mesurés.

Ce projet s'appuie sur la mise au point d'un système de contrôle automatique de la consommation individuelle (DAC) adapté à l'oie. Grâce à l'identification par puce électronique des oies, ces appareils permettent de mesurer la consommation individuelle des animaux élevés en groupes et au sol, dans des conditions qui leur permettent d'exprimer leurs comportements sociaux habituels.

DISPOSITIF EXPERIMENTAL :

Ce projet repose sur une stimulation de la consommation des oies en phase hivernale avec les caractéristiques suivantes :

- Deux lots de 600 animaux de pedigree connu issus de la même population seront analysés, afin de pouvoir estimer des paramètres génétiques avec suffisamment de précision.
- Chaque lot est constitué de 12 loges de 50 animaux, chacune équipée d'un DAC qui permet d'enregistrer la consommation individuelle pendant toute la phase d'élevage. Les oies sont toutes abattues à 31 semaines à la fin de la période de relâchement. Un grand nombre de mesures et analyses seront conduites sur les carcasses et les tissus (foie, muscle, etc.) prélevés sur les animaux euthanasiés.
- Les cycles lumineux seront contrôlés, simulant la période pré-migratoire automnale par un raccourcissement de la durée du jour.

RESPECT DU PRINCIPE DES 3 R :

- Remplacer : L'étude, à visée agronomique, porte sur la faisabilité d'une alternative au gavage et ne peut se dispenser de mesurer les animaux concernés.
- Réduire : Par la modélisation du fonctionnement de la population concernée, nous avons déterminé quels effectifs mettre en place. Nous nous sommes attachés à garantir la qualité statistique des paramètres estimés (biais minimal, précision maximale) avec le moins d'animaux possible. Nous mesurerons donc 2 cohortes apparentées de généalogie connue de 600 animaux. Soit 1200 animaux en tout.
- Raffiner : A l'exception d'une prise de sang et de la pose d'un transpondeur permettant l'identification des animaux et l'établissement du pedigree, aucune procédure occasionnant douleur ou détresse ne sera appliquée aux animaux. Au contraire, les animaux sont élevés en groupes, au sol et peuvent exprimer leurs comportements sociaux.

12951 CONTEXTE

Les cancers du foie, primitifs (carcinome hépatocellulaire) comme secondaires (métastases hépatiques) représentent un problème majeur de santé publique. Le cancer primitif du foie survient le plus souvent dans des organes endommagés par une hépatite virale, l'alcoolisme ou l'obésité. La prise en charge thérapeutique implique plusieurs stratégies, notamment la greffe hépatique, mais

également un traitement local (résection, ablation) et la thérapie focale par agents physiques, principalement par radiofréquence. Cependant, à ce jour, seuls environ 25% des patients sont traités avec une visée curative. Dans le cas des métastases hépatiques, le seul traitement à visée curative est la chirurgie de résection mais la majorité des patients (entre 70 et 80 %) ne sont pas candidats en raison d'un volume hépatique restant insuffisant, d'une localisation tumorale contre-indiquant la résection ou de conditions anesthésiques insuffisantes. Pour réduire la taille des tumeurs, des traitements multimodaux en plusieurs temps ont été développés afin d'épargner le maximum de tissu sain. Dans ce contexte, les traitements focalisés par des agents physiques (Cryothérapie, radiofréquence, micro-onde) ont connu un essor considérable.

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

Ainsi, un traitement totalement non invasif par ultrasons focalisés des tumeurs hépatiques semble être une approche prometteuse mais nécessite de nombreuses innovations qu'aucune équipe du domaine n'a pu réaliser à ce jour.

Après avoir démontré dans un projet précédent la faisabilité d'atteindre le foie par les HIFU pendant des phases d'apnée, nous souhaitons à présent conduire un projet dédié à l'estimation de la reproductibilité de ces résultats avec un suivi sur 7 jours des animaux post-traitement HIFU et en appliquant des HIFU sans recourir à une apnée.

OBJECTIF

L'objectif primaire sera donc d'évaluer la tolérance à moyen terme (J7) et d'évaluer la faisabilité de lésions HIFU, lors d'une procédure non invasive, sans apnée. Le mouvement respiratoire sera utilisé de manière avantageuse pour élargir le volume traité en répartissant mieux la chaleur produite par les ultrasons.

Les objectifs secondaires seront :

1-D'évaluer la reproductibilité des lésions.

2-De caractériser au mieux les lésions entraînées par les HIFU (échographie, prélèvement des tissus)

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

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

Au cours de la première procédure, 1 animal subira des expositions HIFU d'environ 1.5 cm³ sous anesthésie et sous contrôle échographique puis sera mis à mort dès la fin de l'intervention afin de valider le traitement HIFU sans apnée. Les 9 autres animaux seront maintenus en vie après le traitement HIFU pendant 7 jours puis mis à mort. A l'issue des procédures, les animaux seront autopsiés et les foies seront prélevés pour analyses.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

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

Réduire : 1 animal (première procédure sans réveil) subira un traitement HIFU supplémentaire au niveau de la vessie en préambule d'un autre projet utilisant le même matériel.

Raffiner : Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance et est bien maîtrisé. La sonde sera manipulée par un manipulateur expérimenté. Pendant les anesthésies, les animaux seront monitorés (température, fréquence cardiaque et respiratoire). Des points limites précoces ont été définis avec une mise en place de critères d'arrêt pour éviter toute souffrance.

12952 Les liquides biologiques tels le sang, l'urine ou le lait permettent de fournir des composés utiles dans le diagnostic ou la mesure dans de nombreux contextes cliniques ou dans la science fondamentale pour évaluer l'état de l'organisme. Les rongeurs sont les animaux de laboratoire le plus couramment utilisé. En Europe, les souris représentent près de 61 % des animaux de laboratoire et les rats près de 14 %. Les rongeurs sont les plus utilisés dans la recherche expérimentale étant un modèle présentant des caractéristiques proches de l'humain et une grande définition et stabilité génétique, ce qui en fait un modèle de choix pour les pathologies humaines. Ils représentent les modèles animaux dans les domaines tels que l'oncologie, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et métaboliques, l'immunologie, etc. Lors de protocoles expérimentaux ou pour des travaux sur des produits dérivés d'animaux, il peut être demandé de prélever du sang, de l'urine ou du lait afin de les analyser dans le but de compréhension d'un état physiologique ou pathologique. Le prélèvement sanguin est une des manipulations la plus fréquemment effectuée sur les animaux de laboratoire. Les contrôles métaboliques d'urine et de lait permettent d'étudier diverses fonctions : comportement alimentaire, fonction rénale, fonction des glandes mammaires... Ce projet a pour but d'avoir des produits liquides biologiques issus de rongeurs vigils pour nos clients en vue de leur utilisation dans leurs études expérimentales. Plusieurs prestations sont réalisées pour nos clients sur nos rats et souris : prélèvement de sang dans la veine mandibulaire chez la souris, prélèvement de sang dans la veine latérale caudale et dans la veine sublinguale chez le rat (avec anesthésie à l'isoflurane), prélèvement d'urine avec isolement en cage métabolique, prélèvement de lait avec isolement et injection d'ocytocine stimulant l'éjection du lait. Ainsi, au total sur 5 ans, le nombre d'animaux prévus d'être utilisés est de 700 rongeurs, 350 rats et 350 souris. Les liquides biologiques sont prélevés sur des animaux préparés selon la règle des 3R pour les principes de réduction et de raffinement. Afin de limiter l'impact sur l'animal, des règles quant au volume à prélever et à la fréquence de ces prélèvements sont suivies. Ainsi, un animal ne sera pas prélevé à plus de 20 % de son volume sanguin total (correspondant à 1 % de son poids) sur 24h avec une récupération de 3 semaines ou à plus de 15 % de son volume sanguin total en une prise de sang unique avec une récupération de 4 semaines. Une vérification après la ponction et un contrôle les jours suivants du point de collecte du sang sont réalisés sur chaque animal. Pour l'urine, un animal ne sera pas isolé plus de 24h. Les animaux sont isolés dans des cages transparentes côte à côte pour garder un contact visuel et olfactif entre les individus pour limiter le stress de l'isolement. Pour le lait, les femelles ne seront pas prélevées plus d'une fois par jour et pas plus de 5 fois consécutif. Les petits séparés de leur mère sont maintenus dans leur nid au chaud dans leur cage. Suite à la remise de la mère dans la cage avec ses petits, une observation de son comportement est faite le jour même et les jours suivants. L'état des mamelles de chaque femelle est surveillé chaque jour. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement ou hébergés isolés selon la procédure de prélèvement demandé. La manipulation des animaux est réalisée par le même personnel compétent dans la contention et les procédures de prélèvement de sang, d'urine et de lait pour limiter le stress induit par le protocole. Les points limites sont adaptés à chaque procédure et observés tout au long des procédures. Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure du bien-être animal.

12953 Notre travail se base sur l'hypothèse que les tumeurs évoluent et progressent de manière incontrôlée lorsque les réponses immunitaires anti-cancéreuses échouent. Récemment, il a été montré qu'une restriction calorique par le jeûne avant traitement anticancéreux permettait d'améliorer l'efficacité du traitement notamment par régénération des cellules immunes. En effet, une courte période de jeûne protège les cellules normales de l'effet cytotoxique de composés utilisés pour la chimiothérapie des cancers. En parallèle, la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par les composés chimiothérapeutiques était augmentée.

La transposition du jeûne à la chimiothérapie du cancer reste difficile à appliquer dans un contexte clinique ; certains patients pourraient ne pas tolérer un jeûne prolongé. Une stratégie consiste à substituer le jeûne par l'administration de composés capables de mimer la restriction calorique

(CRMs, caloric restriction mimetics). Ce mimétisme se traduit au niveau cellulaire par une réduction de l'acétylation des protéines cytosoliques associée à l'induction de l'autophagie (AP), un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. Ce projet a pour buts de confirmer *in vivo* l'effet de certains CRMs identifiés *in vitro*.

Pour la réalisation de cette étude, nous évaluerons l'induction de l'AP dans les tissus (injection de CRMs en absence et en présence d'un régime gras) et ensuite nous effectuerons des expériences de croissance tumorale.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de la règle des 3R :

Remplacer : Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation de l'autophagie systémique en réponse à la chimiothérapie. En effet, ce projet ayant pour objectif de tester l'efficacité de nouveaux traitements anti-cancéreux (identifiés *in vitro*) qui miment la restriction calorique. Il est actuellement impossible de reconstituer les effets multiples de la restriction calorique *in vitro/ex vivo* du fait de sa complexité. Il est donc absolument nécessaire pour ce projet d'utiliser un modèle *in vivo*.

Réduire : Ce projet, d'une durée maximale de 3 ans, impliquera l'utilisation de souris (n=620). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser.

Raffiner : Les animaux recevront des greffes de tumeurs en sous-cutanée, une seule par animal. Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie locale (injections) ou générales (greffes). Les tumeurs seront surveillées quotidiennement et mesurées tous les deux jours. L'étude sera arrêtée si les expériences initiales sont négatives par rapport à l'hypothèse de travail (le nombre de souris sera ainsi diminué). Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être. Les animaux sont observés quotidiennement afin de détecter tout problème ou anomalie. La mise en place d'une grille de score pour un suivi strict permettra d'appliquer précocement des points limites afin d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

12954 Le système dopaminergique est classiquement décrit comme étant le système d'apprentissage du cerveau. Les neurones à dopamine sont initialement activés par la nouveauté ou par une récompense. Notre projet a pour objectif de comprendre comment l'exploration d'un nouveau contexte affecte l'activité des neurones à dopamine avec l'hypothèse que ces neurones en s'activant en réponse à un nouvel environnement faciliteront l'apprentissage. Afin que les connaissances fondamentales issues de notre projet puissent être extrapolées à l'Homme, notre étude sera généralisée aux deux sexes. La réalisation du présent projet intervient dans le cadre d'un besoin sociétal croissant mis en avant par le ministère de l'éducation nationale concernant l'amélioration des stratégies d'apprentissage avec les neurosciences. L'avantage évident de ce projet est de confirmer ou d'infirmer de nouvelles stratégies d'apprentissage inspirées par les neurosciences et basées sur une meilleure connaissance de la physiologie des neurones à dopamine, mais nécessite le recours à l'expérimentation animale.

Le but de ce projet est d'établir, chez deux espèces, rats et souris, les modifications à l'échelle du neurone qui se mettent en place au niveau des neurones à dopamine lors de l'exposition à un nouveau contexte. Pour cela, les approches expérimentales principalement utilisées seront : 1) des approches en électrophysiologie *ex vivo* et *in vivo* sur animal anesthésié, pour évaluer l'impact de l'exposition à un nouvel environnement sur l'activité électrique des neurones à dopamine et 2) des analyses immunohistochimiques pour identifier l'influence sur les neurones des effets préalablement caractérisés. Dans ce projet nous utiliserons une lignée de rats transgéniques expriment spécifiquement un marqueur enzymatique au niveau des neurones à dopamine, nous permettant ainsi de les manipuler spécifiquement.

Conformité avec la règle des 3R :

Remplacer : Puisque ce projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités d'intégration contextuelle de l'animal, ce projet ne peut être conduit par des approches de modélisation ou de simulation par ordinateur ou de cultures de cellules. Les souris et les rats sont les deux espèces de rongeurs majoritairement utilisées en neurosciences, cependant il existe une différence d'espèce entre la souris et le rat sur le contrôle synaptique des neurones dopaminergiques. De ce fait, ces deux espèces animales seront étudiées en parallèle dans ce projet. Il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles *in vitro*.

Réduire : Nous prévoyons un maximum de 12 animaux par groupe, nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes. Le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Les approches d'électrophysiologie que nous proposons participent à réduire le nombre d'animaux utilisés, en permettant de multiplier le nombre de variables collectées par animal. Le nombre total d'animaux utilisés sera 528 souris et 1092 rats sur une durée totale du projet de 5 ans.

Raffiner : Les procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Aussi, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement (cages collectives enrichies avec des objets adaptés changés de façon hebdomadaire), avec une attention particulière lors des périodes chirurgicales en utilisant les anesthésiques et antidouleurs appropriés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. Pour définir ces dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance. Pour réduire au maximum les conséquences de ces dommages, nous définirons des points limites suffisamment précoces et mettrons en place des critères d'arrêts. De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés.

12955 Salmonidé introduit sur l'île de la Réunion depuis près de 80 ans, la truite Arc-en-ciel, (*Oncorhynchus mykiss*) est naturalisée (i. e. les individus se reproduisent et donnent naissance à une descendance viable) dans certains cours d'eau d'altitude. Elle fait également l'objet d'opérations annuelles de ré-empoissonnement sur d'autres secteurs plus aval, dans l'optique d'une pêche récréative à la ligne. Ainsi, son statut sur l'île est ambigu, puisqu'il s'agit à la fois d'une espèce introduite et potentiellement invasive, mais aussi d'une espèce à fort potentiel pour la pêche.

Cette étude répond à la demande mentionnée dans l'arrêté interministériel du 09/02/2018 relatif à la prévention de l'introduction et de la propagation des espèces animales exotiques envahissantes sur le territoire de l'île de la Réunion. A son terme, elle doit étayer les recommandations d'intervention vis-à-vis de l'espèce (éradication ou maintien sous conditions).

Pour cela, il convient 1- d'acquérir les connaissances suffisantes sur le fonctionnement démographique des populations naturalisées et de celles soutenues par des empoissonnements, pour mieux évaluer le risque d'une expansion incontrôlée, et 2- de déterminer les impacts de l'espèce sur l'écologie des rivières réunionnaises.

Dans le cadre de l'étude démographique (point 1- cité ci-dessus), des opérations de marquage individuel et recapture sont programmées, pour permettre d'estimer les paramètres clés de la dynamique des populations de truites introduites (croissance, âge à première reproduction, survie interannuelle). Pour cela, des marques passives (c'est-à-dire sans batterie) de type PIT-tag seront injectées sous anesthésie dans la cavité abdominale des truites. C'est cette procédure (anesthésie et marquage par PIT-tag) qui fait l'objet de la présente demande.

Entre 2019 et 2021, les marquages PIT-tag se dérouleront sur 2 secteurs où les populations sont naturalisées et 2 secteurs où les populations sont maintenues artificiellement par déversement (populations soutenues), chaque secteur étant situé sur une rivière différente. Selon les difficultés rencontrées sur le terrain et les abondances observées, 800 truites Arc-en-ciel seront marquées dans le milieu naturel.

Conformité avec la règle des 3R :

Remplacer : L'objectif étant l'apport de connaissances sur le fonctionnement des populations de cette espèce introduite sur l'île, le remplacement est hors sujet.

Réduire : Le nombre de poissons marqués (800 sur les 4 secteurs d'étude) doit être suffisant pour obtenir des recaptures en assez grand nombre pour alimenter les modèles d'analyses dédiés aux données de type capture-marquage-recapture.

Raffinement : Des PIT-tag de petite taille (12 mm) de qualité chirurgicale seront utilisés, en respectant la taille minimale du poisson à marquer (5 cm) fixée selon les recommandations en vigueur. Les poissons seront capturés par pêche électrique, moins traumatisante pour le poisson que tout autre méthode de capture. Avant marquage, les poissons seront anesthésiés avec une solution de benzocaïne. Nous utiliserons des injecteurs stériles à usage unique. Une fois marqué, chaque poisson sera surveillé quelques minutes dans un bac de réveil rempli d'eau fraîche pour s'assurer de sa bonne récupération, avant sa remise à l'eau dans la rivière.

12956 Maîtriser la perte des protéines lors d'atrophies musculaires intenses (pathologiques ou physiologiques) par le biais de leur synthèse et/ou de leur dégradation est un des objectifs majeurs de notre laboratoire.

La protéolyse, et plus particulièrement le système protéolytique protéasome dépendant (UPS), est souvent la composante majeure de la fonte protéique musculaire. L'UPS contrôle finement le devenir de nombreuses protéines cellulaires qui, très schématiquement, sont "marquées" par l'action de 2 familles d'enzymes, les E2 et les E3, qui travaillent de concert. A la suite de ce marquage, les protéines ciblées sont dégradées. Le processus de marquage est donc à la base de l'activité de l'UPS et constitue une cible thérapeutique potentielle. Nous savons aussi que l'UPS est l'acteur principal de l'atrophie musculaire qui survient au cours de nombreux états pathologiques (cancers, insuffisance rénale, etc.). De précédents travaux ont permis d'identifier la seule enzyme E3 (appelée MuRF1) responsable de la perte de muscle squelettique au cours d'une pathologie.

Le système UPS étant particulièrement complexe, nous avons effectué ces dernières années de nombreuses études sur des cellules en culture ou *in vitro* qui nous ont permis, sans utiliser d'animaux, d'identifier les couples E2-MuRF1 responsables de la dégradation des principales protéines musculaires. Nos travaux actuels consistent à synthétiser des molécules capables d'empêcher la dégradation de ces protéines musculaires et donc de préserver le muscle squelettique au cours d'une pathologie.

Bien que de nombreuses études sont actuellement effectuées sur cultures de cellules, l'utilisation d'animaux est obligatoire pour tester l'efficacité des molécules de synthèse. Les études décrites dans cette demande sont directement à relier au respect de la règle des 3R en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE. En effet, nous effectuerons des essais sur cellules en culture pour (1) restreindre le nombre de molécules à tester, (2) déterminer la toxicité des inhibiteurs sur différentes lignées cellulaires et (3) déterminer les concentrations optimales pour chaque molécule. Ceci permettra de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour les expériences. Cependant, un total de 850 souris devra être utilisé pour tester les différentes molécules de synthèse (10 au total).

Bien que les études effectuées sur cellules en cultures permettent de tester de nombreux paramètres, il est possible que certaines molécules de synthèse engendrent des effets indésirables. Nous serons donc particulièrement vigilants au bien-être des animaux. L'absence de souffrance des animaux pendant le protocole sera notamment apprécié par des signes comportementaux (réduction de l'appétit, fuite ou défense à la manipulation, vocalises, automutilation, etc.) et corporels (poil piqué, terne, poil hérissé, etc.). Cet aspect est développé dans le paragraphe 3. 2.

Ces études correspondent à une pré-expérimentation destinée à déterminer les concentrations utilisables sur animaux, le mode d'administration, la demi-vie et l'innocuité des inhibiteurs sélectionnés. Ces travaux seront suivis d'une autre demande pour une expérimentation qui permettra d'identifier la molécule la plus efficace.

12957 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), forme la plus sévère d'insuffisance respiratoire aiguë chez l'homme, est associé à une mortalité élevée d'environ 35%, notamment du fait d'un manque de traitement spécifique. Le SDRA se caractérise par un dommage alvéolaire diffus à l'origine d'une destruction de l'architecture pulmonaire normale, conséquence d'une importante inflammation pulmonaire. Celle-ci est due à des causes variées soit directes (SDRA d'origine pulmonaire consécutifs à une pneumonie, à l'inhalation de fumées, à une noyade...), soit indirectes (SDRA d'origine extra-pulmonaire consécutif à une infection d'un autre organe, à une pancréatite, à une chirurgie cardiaque...).

Plusieurs travaux montrent l'importance d'une réponse inflammatoire équilibrée et d'une réparation alvéolaire efficace pour une bonne évolution des patients. La réparation alvéolaire nécessite la multiplication des cellules épithéliales alvéolaires sur une nouvelle matrice extracellulaire produite par les fibroblastes pulmonaires, recrutés et activés au niveau des alvéoles agressées. De nombreux facteurs de croissance sont nécessaires à cette réparation. De plus, la coordination entre les différents types cellulaires est indispensable pour éviter un défaut, ou à l'opposé un excès, de réparation alvéolaire, sources tous deux de séquelles respiratoires voire de décès chez les patients atteints.

Les macrophages alvéolaires participent activement à cette régulation de la réparation et à la production de facteurs de croissance. La quantité de macrophages augmente de façon importante dans les alvéoles lésées durant les premiers jours suivant l'agression, suite au recrutement et à la différenciation des monocytes sanguins. Les macrophages présentent la caractéristique de pouvoir moduler leurs fonctions cellulaires (appelées "phénotype") en fonction du micro-environnement dans lequel ils se situent. Cette modulation de leur phénotype en réponse aux signaux de l'environnement dans lequel ils évoluent est appelé « polarisation ». Les grands types caractéristiques de polarisation des macrophages sont la polarisation inflammatoire (appelée "M1"), la polarisation pro-réparatrice (appelée "M2a"), et la polarisation anti-inflammatoire (appelée "M2c"). L'évolution de la polarisation des macrophages depuis la polarisation inflammatoire M1 vers la polarisation anti-inflammatoire M2c est nécessaire à une réparation pulmonaire harmonieuse. En effet, un excès de polarisation inflammatoire (en intensité ou en durée) entraînera de nouvelles lésions pulmonaires chez les patients, et au final des séquelles respiratoires voire le décès des patients. De même, l'excès de polarisation pro-réparatrice M2a entraînera une réparation excessive dépassant les objectifs et générant de la fibrose pulmonaire potentiellement fatale. Ainsi, plusieurs données observées chez l'Homme et plusieurs données expérimentales obtenues dans des modèles animaux suggèrent un rôle bénéfique de la polarisation anti-inflammatoire M2c des macrophages pulmonaires pour la réparation alvéolaire. Toutefois, à ce jour, le bénéfice d'un traitement basé sur la modulation de la polarisation macrophagique n'a jamais été évalué. Le but de ce travail est d'évaluer l'effet de la reprogrammation macrophagique pulmonaire anti-inflammatoire sur la réparation alvéolaire et le pronostic des animaux traités. La confirmation d'un effet bénéfique induit par cette repolarisation pourrait permettre de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques du SDRA chez l'Homme.

Ce travail sera effectué dans deux modèles murins d'agression alvéolaire aiguë, induits par l'instillation intra-trachéale sous anesthésie générale d'un composé bactérien (le LPS) pour mimer les SDRA de causes infectieuses, et par l'acide chlorhydrique pour mimer les SDRA de causes chimiques. Dans chaque modèle, deux techniques de modulation de la polarisation seront utilisées pour induire une polarisation anti-inflammatoire des macrophages pulmonaires des animaux traités. Les résultats attendus sont une amélioration de la réparation pulmonaire des animaux traités par repolarisation anti-inflammatoire de leurs macrophages.

Le nombre de souris nécessaires à l'ensemble du projet, d'une durée prévue de 4 ans, est calculé à 495 animaux. Un maximum d'attentions a été porté pour remplacer les expériences utilisant des animaux chaque fois que possible et pour réduire le nombre d'animaux utilisés quand aucune alternative n'était possible, notamment par le développement d'un maximum de mises au point sur des cellules de lignée murines *in vitro*. De plus, le nombre nécessaire d'animaux a été déterminé à partir d'analyses statistiques et de modélisation à partir de résultats préliminaires, permettant de limiter le nombre d'expérimentations animales au strict nécessaire pour la démonstration des

hypothèses. Enfin, les conditions d'expérimentation respecteront le raffinement notamment en terme de conditions d'élevage (nombre d'animaux par cage, température, etc.), de manipulation des animaux uniquement par du personnel formé, d'expérimentations toutes effectuées sous anesthésie générale, de maintien de la température corporelle des animaux pendant les procédures expérimentales, et de la mise en place d'une grille d'évaluation du bien être animal et la définition de points limite au-delà desquels les animaux seront euthanasiés pour éviter toute souffrance. Tous les animaux de ce projet seront euthanasiés sous anesthésie générale profonde à la fin de la procédure.

12958 L'épilepsie est la maladie neurologique la plus répandue après la migraine et touche près de 50 millions de personnes dans le monde et 600 000 en France. Environ 30% des patients sont résistants aux traitements médicamenteux. Ce taux de pharmacorésistance n'a hélas pas changé depuis les années 1950 car les mécanismes sous-tendant l'épilepsie sont toujours mal connus. En plus des crises, de nombreuses comorbidités, comme de profonds troubles mnésiques, handicapent les patients. Ces troubles mnésiques ne sont pas pris en charges au niveau thérapeutique et sont souvent encore plus invalidants que les crises. Il est donc indispensable de disposer d'une approche pertinente permettant de comprendre les mécanismes du développement de cette pathologie afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter à la fois les crises et les déficits cognitifs associés.

Le projet de recherche que nous voulons mener pour 3 ans consiste à déterminer comment les crises se développent et quelles sont les origines des troubles mnésiques. Pour cela, nous allons développer et utiliser des modèles animaux pertinents reproduisant de nombreuses caractéristiques de la pathologie. Notre but est de déterminer le plus grand nombre de mécanismes sous-tendant la genèse et la propagation des crises ainsi que l'apparition des déficits mnésiques dans le contexte des épilepsies généralisées et focales. La description de ces mécanismes pourra idéalement fournir des marqueurs prédictifs de la maladie qui pourraient être à terme transférés à l'Homme.

Ce projet implique d'associer trois approches expérimentales : la genèse d'un modèle d'épilepsie, l'enregistrement de l'activité cérébrale et métabolique chez l'animal vigile, et des tâches comportementales testant différents paramètres de la mémoire chez ces animaux épileptiques. Pour induire l'épilepsie, un agent épileptogène est injecté chez des rats naïfs qui vont développer un status epilepticus. Il s'en suit une phase de latence, sans crises où le cerveau se remanie et la maladie s'installe, c'est l'épileptogenèse, jusqu'à l'apparition de crises spontanées. Les animaux seront équipés de microélectrodes permettant d'enregistrer l'activité cérébrales ainsi que le métabolisme cérébral tout au long de ce processus. Les tests mnésiques seront réalisés à différents stades du développement de la pathologie

Ce projet est conforme avec les exigences de la règle des 3R. Comme l'épilepsie ne peut être appréhendée que sur des individus réactifs, il est nécessaire d'utiliser des animaux vigiles pour ce type d'étude. L'approche expérimentale de cette étude utilise des rats qui seront réutilisés à travers différents protocoles.

Remplacement ; Le caractère méconnu du fonctionnement cérébral implique que ce projet ne peut pas se passer de l'utilisation d'animaux afin d'en déterminer les mécanismes de dysfonctionnement dans le cadre de l'épilepsie. Les résultats de notre étude permettront de caractériser des marqueurs biologiques potentiels afin de les extrapoler à plus long terme chez l'Homme pour y apporter de nouvelles approches de dépistage et pistes thérapeutiques.

Réduction ; Ce projet utilise des outils de collection des données à la pointe de la technologie nous permettant d'obtenir des données fiables sur un faible échantillon. De plus, des tests statistiques adéquats nous permettront de limiter la taille des cohortes à un minimum (224 rats au total sur 3 ans pour 4 expérimentateurs).

Raffinement ; Ce projet propose des méthodes pertinentes pour limiter la douleur : des points limites adaptés et précoces ont été mis en place pour chaque procédure (comme les interventions chirurgicales) et prévoient des interventions rapides sur l'animal (analgésie et suivi post-opératoire, et suivi quotidien des animaux). En effet, tous les actes invasifs seront pratiqués sous anesthésie

générales utilisant le l'isoflurane ou une association de kétamine-xylazine-ropivacaine. Il améliore le bien-être animal car les conditions d'hébergement (animaux à deux dans de grandes cages, eau et nourriture ad libitum, enrichissement avec nid végétal, tubes en cartons et divers objets) ont été élaborées pour minimiser au maximum le stress qui est néfaste à tout paradigme expérimental. Toutes ces conditions sont conformes à la législation en vigueur et permettent d'être au plus près du comportement naturel de l'espèce animale. A la fin du protocole, les animaux seront euthanasiés (par overdose d'Euthasol) et le prélèvement du cerveau sera effectué afin d'analyser sur le plan anatomique et morphologique l'impact de l'épilepsie.

12959 Les pathologies vestibulaires se caractérisent par des épisodes récurrents de vertiges, associés à des déséquilibres posturaux, au repos ou lors du déplacement. Ces atteintes sont souvent accompagnées d'étourdissements et de nausées, ainsi que des difficultés à fixer le regard pendant le mouvement. Cet ensemble de symptômes impacte considérablement les activités les plus élémentaires de la vie quotidienne. En France, comme aux Etats Unis, le vertige constitue le 3e motif de consultation chez le généraliste et représente 5% des urgences hospitalières. Différents modèles animaux ont été développés depuis plusieurs décennies afin de reproduire les pathologies vestibulaires rencontrés chez l'Homme. Ces modèles permettent d'étudier les mécanismes neurobiologiques pour mieux comprendre les pathologies vestibulaires et leur évolution dans le temps. De plus, ces modèles permettent de tester des solutions thérapeutiques via des approches pharmacologiques (médicament anti vertigineux) ou rééducationnelles (rééducation des fonctions posturales, locomotrices et de stabilisation du regard). Le modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale développé chez le rongeur consiste à sectionner chirurgicalement le nerf vestibulaire en provenance de l'oreille interne. Les intérêts de ce modèle sont :

1) De reproduire la pathologie vestibulaire observée chez l'Homme. C'est-à-dire les mêmes altérations posturales, locomotrices, oculomotrices et perceptives.

2) La durée totale du syndrome vestibulaire est significativement réduite chez le rat (2 semaines) comparativement au chat (40 jours) ou à l'Homme (90 jours). Ce gain temporel est avantageux d'un point de vue appliqué dans le cadre de l'étude de composés anti vertigineux sur les différentes phases du syndrome, mais également d'un point de vue fondamental dans la compréhension des mécanismes neurobiologiques.

Après Neurectomie Vestibulaire Unilatérale (NVU) chez le rongeur, les neurones vestibulaires dans le tronc cérébral (partie basse du cerveau) situé du côté de la lésion vont diminuer leur activité électrique, tandis que ceux du côté opposé vont l'augmenter. Ce déséquilibre d'activité électrique dans le cerveau est à l'origine du syndrome vestibulaire. Au cours du temps, on assiste à la restauration de l'activité spontanée des neurones vestibulaires du côté de la lésion et donc un retour à l'équilibre électrique dans le cerveau. Ce phénomène est corrélé avec la disparition quasi-totale du syndrome vestibulaire et est considéré dans la littérature comme étant le paramètre clef de la restauration fonctionnelle. Le projet proposé s'intéresse aux acteurs cellulaires et moléculaires responsables du rééquilibrage électrique dans le cerveau après NVU.

Les 3 premiers jours après NVU sont une période critique pour le système vestibulaire. La NVU induit un déficit d'activité électrique dans l'environnement vestibulaire (tronc cérébral) lésé à l'origine de la pathologie vestibulaire. Le système vestibulaire va devoir trouver des stratégies pour contrer ce déficit. Une des solutions pour restaurer l'activité électrique et donc la fonction vestibulaire est de modifier pendant cette période de 3 jours, la quantité de 2 protéines membranaires importantes pour l'activité électrique du cerveau : le KCC2 et le récepteur GABAA. A partir de ces observations nous avons donc opté pour l'étude de marqueurs spécifiques de l'activité neuronale après NVU : les KCC2 et les NKCC1, le récepteur GABAA et le segment initial de l'axone (site de genèse des potentiels d'action du neurone). Afin de réaliser l'ensemble du projet en 2 parties, 176 rats seront utilisés. En première partie une cohorte de 88 rats répartis en 11 groupes sera utilisée afin d'étudier l'effet d'activateurs et d'inhibiteurs des KCC2 au moyen de tests comportementaux afin d'évaluer la pathologie vestibulaire et son évolution temporelle. D'un point de vue thérapeutique, cette partie permettra de mettre en évidence les doses optimales et les fenêtres temporelles dans lesquelles ces modulateurs sont les plus efficaces en termes de rapidité et de qualité de récupération de

l'équilibre. En deuxième partie nous quantifierons les marqueurs de l'excitabilité sur les neurones vestibulaires du tronc cérébral sur 88 rats répartis en 11 groupes. Cette étude sera réalisée en collaboration avec une autre équipe de recherche et permettra de mieux comprendre le retour à l'équilibre électrique dans le cerveau.

Le projet visant à étudier un syndrome comportemental ainsi que de tester l'effet de composés pharmacologiques sur son évolution requiert à l'évidence l'utilisation d'animaux. La NVU chirurgicale réalisée chez le rat est comparable à la neurotomie vestibulaire pratiquée chez certains patients souffrants de vertiges. De plus, elle reproduit la pathologie vestibulaire rencontrée chez l'Homme. Afin de garantir une couverture analgésique des animaux, une injection de Buprénorphine (0.05mg/kg, sous cutanée) est réalisée 30min avant le début de la chirurgie. Les animaux subissent une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (module d'anesthésie compact + respirateur) pendant la durée de la chirurgie (40 min). La respiration ainsi que la température de l'animal sont contrôlées pendant toute la chirurgie. Avant le réveil des animaux, une injection sous-cutané d'une solution de Ringer Lactate (10 ml/kg) est réalisée visant à compenser les pertes liquidiennes associées à la chirurgie. Les animaux sont ensuite hébergés individuellement et dans des cages avec un enrichissement constitué de cylindre de coton pendant une durée de 3 jours qui correspond à la phase aiguë du syndrome vestibulaire. Pendant cette période les animaux sont observés quotidiennement par le porteur du projet ainsi que les zootechniciens. Cet isolement est nécessaire pour éviter les risques d'étouffement et de blessures. Après cette période de 3 jours les animaux sont de nouveau placés avec un congénère et en milieu enrichi. Le nombre d'animaux a été fixé afin de limiter au maximum le nombre d'animaux nécessaire au projet tout en assurant une validation statistique des résultats.

12960 Dans l'élevage des poules reproductrices une restriction alimentaire sévère est appliquée afin d'éviter un engraissement important conduisant à une mauvaise fertilité. Cette restriction conduit à des comportements agressifs fortement remis en cause par la commission européenne. Il apparaît donc important de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la prise alimentaire chez cette espèce afin de mieux la contrôler. La chemerine est une hormone produite par le tissu adipeux et le foie. Chez les mammifères, elle diminue la prise alimentaire. Des travaux récents montrent qu'elle est capable aussi de modifier la flore intestinale et par conséquent modifier la digestibilité des aliments. Cependant, aucune donnée n'est disponible chez la volaille. Notre laboratoire dispose de protéine recombinante de chemerine de poulet ainsi qu'un anticorps dirigé spécifiquement contre cette protéine. L'objectif de notre étude est de mieux comprendre le rôle de la chemerine dans le contrôle de la consommation et la digestibilité alimentaire chez la poule reproductrice en croissance. Cent (n=100) poules reproductrices de souche chair seront utilisées dans ce projet. Le protocole respecte le principe des 3R : -remplacement : la prise alimentaire et l'utilisation digestive et métabolique font intervenir un ensemble de mécanismes complexes. La construction d'un modèle *in silico* ou *in vitro* pour prédire ces phénomènes n'est pas possible à cause du manque de données. Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*. -réduction : le nombre d'animaux a été réduit à son minimum en tenant compte 1. De la distribution et l'homogénéité des poids des animaux attendus au moment de la procédure expérimentale et 2. de la puissance permettant de montrer une différence significative entre traitements et pertinente d'un point de vue biologique sur la consommation alimentaire, la digestibilité et les paramètres sanguins étudiés. -raffinement : pour limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux, plusieurs mesures seront mises en place. Les poussins seront hébergés au sol en groupe pendant une semaine à une densité inférieure au maximum autorisé. Un minimum de 4 poussins par groupe est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins et respecter la taille moyenne d'une couvée. La durée de la procédure expérimentale sera limitée à 2 semaines. Des enrichissements appropriés au milieu de vie (au sol et en cage individuelle) seront mis en place. Les animaux seront visités au moins une fois par jour.

12961 L'imagerie moléculaire, notamment par tomographie par émission de positons (TEP), est un outil largement validé et utilisé en oncologie générale. Elle est cependant sous employée en neuro-oncologie alors même que l'évaluation en imagerie des gliomes est un des points fondamentaux dans la prise en charge des patients. La détection et le suivi d'un gliome augmente considérablement les chances de réussite de traitements. L'imagerie des tumeurs cérébrales doit relever de nombreux défis, notamment celui de l'estimation précise de l'activité de la tumeur et de son volume actif. Cependant, très peu d'agents d'imagerie, ou marqueurs, en TEP clinique permettent de diagnostiquer et de suivre l'évolution des tumeurs cérébrales.

Notre laboratoire est engagé depuis plusieurs années dans l'imagerie *in vivo* par TEP sur différents modèles de cancer tels que les cancers du sein, du cerveau (notamment le gliome) et du poumon.

La compréhension de l'interaction des marqueurs avec leur cible permettra de proposer des méthodes d'imagerie pour le diagnostic et le suivi thérapeutique. Elle permettrait également d'optimiser les traitements en améliorant leur dose tout en prévenant l'apparition d'effets indésirables. Cette compréhension exige de connaître l'action des médicaments sur l'organisme (étude en pharmacodynamique) et le devenir des médicaments dans l'organisme (étude en pharmacocinétique) du marqueur.

Les approches de pharmacologie *in vitro* produisent des informations à l'échelle de la cellule sur l'interaction du marqueur et de sa cible. Des marqueurs peuvent être ainsi sélectionnés/modifiés. Cependant ces approches *in vitro*, bien que nécessaires, ne sont pas suffisamment prédictives de l'efficacité et/ou de la toxicité du marqueur. Ces dernières dépendent du devenir du marqueur dans l'organisme, de sa disponibilité au niveau des tissus cibles dont la structure et la composition sont extrêmement complexes.

Le recours à un modèle *in vivo*, et donc un modèle animal, est alors indispensable. L'imagerie TEP permet, grâce à un système de radiomarquage, de mesurer l'interaction du médicament avec sa cible biologique et de suivre sa distribution dans les différentes régions de l'organisme.

Pour notre étude, il s'agit de modèles rongeurs. Son objectif est de mettre au point pour plusieurs marqueurs un protocole d'imagerie TEP capable de révéler leur interaction avec leur cible biologique. Aux doses prévues dans cette étude, aucune toxicité ni aucune souffrance ne sont attendues : l'imagerie TEP, technique non invasive, est très sensible et ne nécessite donc pas d'injection intraveineuse importante du marqueur. Pour réaliser les examens d'imagerie TEP, un radiotracer spécifique d'une cible pharmacologique est utilisé. Ces examens sont réalisés chez des animaux « contrôle » ayant reçu un placebo, et chez des animaux ayant reçu le traitement testé à différentes doses.

Sur la base des résultats attendus, le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés, serait de 555 sur la durée de l'étude, c'est-à-dire 5 ans. Ce nombre d'animaux a été calculé (i) pour démontrer les performances diagnostiques des biomarqueurs d'imagerie et (ii) pour mettre en évidence un effet thérapeutique statistiquement significatif. Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole ce qui permet de diminuer l'état de stress et d'améliorer leur bien-être. Ils seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Les interventions sur les animaux sont réalisées sous anesthésie pour éviter d'éventuelles douleurs. Les animaux seront étroitement suivis tout au long de l'étude, permettant l'application des critères d'arrêt en amont afin d'empêcher toute souffrance animale.

12962 Ce projet de recherche chez les rongeurs vise à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques des troubles du comportement alimentaire (TCA) telle que l'anorexie mentale (AN ; Anorexia Nervosa) pour le développement des nouvelles approches thérapeutiques. Les TCA sont des maladies liées au stress physique et/ou psychologique mais les mécanismes subjacents ne sont pas connus. Une découverte récente du rôle d'une protéine bactérienne ClpB (pour caseinolytic protease B) produite par l'ensemble de la famille des Enterobacteriaceae pour la production d'autoanticorps contre la melanotropine (alpha-MSH ; alpha-melanocyte-stimulating hormone), a permis de faire un lien moléculaire entre les bactéries intestinales et une altération du

comportement alimentaire. En effet, les taux plasmatiques d'anticorps anti-alpha-MSH ont été associés avec la sévérité des symptômes psychopathologiques de patients de TCA qui possédaient également des taux élevés de ClpB. Ces données suggèrent que la neutralisation de ClpB pourrait améliorer le comportement alimentaire et anxieux aux cours des TCA. Ainsi, dans ce projet de recherche nous allons analyser le changement des taux plasmatiques de ClpB sur les modèles expérimentaux du stress chez les rongeurs et nous allons tester sur ces modèles si une immuno-neutralisation de ClpB pourrait améliorer le comportement alimentaire et anxieux. Dans ce projet, nous allons utiliser au total 400 souris dans les modèles comportementaux classiques connus pour être proches de la symptomatique des TCA : le modèle du stress moyen chronique (CMS ; chronic mild stress) et le modèle de l'anorexie liée à l'activité physique (ABA, activity-based anorexia). L'immuno-neutralisation de ClpB sera effectué par l'injection intraperitoneale des anticorps murin anti-ClpB. Afin de réduire, raffiner et remplacer l'utilisation des animaux nous allons : 1) Choisir des clones d'anticorps par un criblage d'affinité *in vitro*, afin de réduire le nombre des clones à tester *in vivo* ; 2) Limiter les expériences absolument indispensables aux modèles animaux des TCA ; 3) Exploiter au maximum les données obtenues lors d'une expérimentation ; 4) Appliquer les points limites, afin de supprimer la détresse liée à la perte du poids.

12963 Nos projets visent à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) qui présentent soit une insensibilité soit une résistance aux thérapies conventionnelles et indiqués dans ces cancers. Le cancer des voies aérodigestives supérieures est le 5ème cancer le plus fréquent en France et représente la 7ème cause de mortalité par cancer. En France, en 2010, on a estimé 14 000 nouveaux cas de cancers des VADS et 5000 décès par an. Le traitement repose sur l'ablation de la tumeur par chirurgie, lorsqu'elle est possible, associée à la chimiothérapie (cisplatine) et à la radiothérapie (photonothérapie) selon les stades et l'extension.

La procédure a pour but de prouver que l'anti-angiogénique cabozantinib et l'immunothérapie (anti-PD1) induisent une régression tumorale, et que la combinaison ces deux traitements bloque le développement tumoral (synergie). De plus, nous déterminerons la dose minimale de cabozantinib permettant cette synergie, dans le but de diminuer la toxicité de cette molécule observée en clinique. Ces expériences ont pour objectif de proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancers VADS.

Avant de passer au modèle *in vivo*, toutes nos expériences ont été préalablement validées *in vitro* (et *in vivo* pour l'efficacité du cabozantinib chez la souris nude). Nous avons également effectué une large recherche bibliographique. Il n'existe pas de méthodes alternatives ni substitutives à l'utilisation de souris pour nos objectifs (étude préclinique nécessaire avant un essai clinique de phase 1/2 chez l'homme).

Nous utiliserons pour ce projet un total de 80 souris. Ces souris possèdent un système immunitaire nécessaire pour visualiser l'effet de l'immunothérapie (traitement réactivant le système immunitaire). Le traitement par cabozantinib se fera par administration orale (gavage, pour mimer l'administration par cachet chez l'homme) et le traitement par immunothérapie se fera par injection intrapéritonéale (qui mime les injections intra-veineuses chez l'homme). Les souris âgées de 6 à 8 semaines seront mis dans des cages enrichies (maison et morceaux de papiers) sur portoirs (5 animaux/cage), nourriture et boisson ad libitum. Les expériences seront menées de sorte qu'aucune souris ne reste isolée. Les expérimentateurs procéderont à une évaluation quotidienne de l'état général des souris pour déterminer la présence de signes de stress ou de souffrance (attitude soumise, dos voûté, respiration difficile, extrémités pâles, démarche anormale, diarrhée). En cas de stress ou de souffrance important et/ou persistant, les animaux seront systématiquement euthanasiés (cf. section des points limites). A la fin de l'expérimentation, tous les animaux seront euthanasiés.

En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études *in vivo* sont nécessaires et incontournables.

12964 Nous cherchons à isoler des cellules du foie (hépatocytes) de Rats ou de Souris pour des études en culture cellulaire, notamment liées à des recherches sur la toxicité de composés

pharmacologiques. Ces cellules permettraient ensuite d'effectuer des protocoles utilisant peu d'animaux pour fournir les hépatocytes, ce qui permet de satisfaire aux considérations de réduction éthiques. A terme, l'utilisation de cultures d'hépatocytes pourrait même constituer une méthode alternative pour certains projets de toxicité, avec ainsi agir pour le remplacement du modèle animal actuellement utilisé. Pour cette mise en place chez la Souris et le Rat, nous prévoyons un certain nombre d'animaux afin de valider ce protocole complexe, puis un effectif récurrent afin de maintenir la compétence sur la durée complète de l'autorisation afin de former le nouveau personnel.

Le but de ce projet est donc de réaliser l'intervention chirurgicale sous anesthésie générale afin de perfuser les animaux sans douleur. Cette technique permet de préparer les tissus pour récupérer les cellules du foie et les isoler.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 50 Souris et de 50 Rats pour la mise en place de la technique, du fait de la complexité de cette mise en place.

Néanmoins, nous essaierons de réduire ce nombre autant que possible afin de satisfaire aux besoins de réduction des normes éthiques. Les cellules isolées seront testées et le protocole sera validé selon la viabilité des cellules obtenues. Dès lors, nous n'utiliserons des animaux que pour la formation, en considérant un maximum de 10 rats et 10 souris par an.

Sur la durée du projet, un maximum de 90 animaux par espèce seront employés (50 la première année puis 10 pour les années suivantes), soit 90 souris et 90 rats.

12965 Le cancer bronchique non à petites cellules a connu des avancées thérapeutiques importantes grâce au développement de thérapies ciblées. Le meilleur exemple de cette approche est représenté par les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR). Néanmoins tous les patients traités par TKI-EGFR finissent par présenter une progression tumorale, du fait de l'émergence de mécanismes de résistance, comme l'amplification du récepteur membranaire MET. Il n'existe actuellement aucune donnée sur les modifications phénotypiques des cellules tumorales induites par l'activation de MET, en dehors de l'amplification, et l'efficacité des TKI-MET dans ce contexte est inconnue. Notre objectif est de montrer que l'activation de MET, lors de la résistance au TKI-EGFR, confère aux cellules tumorales un phénotype plus agressif grâce à l'acquisition de propriétés supplémentaires telles que l'invasion, la migration ou la résistance à l'apoptose et confère ainsi des capacités métastatiques accrues. Dans un premier temps, ces propriétés seront étudiées *in vitro* à l'aide de cellules cancéreuses pulmonaires EGFR-mutées présentant des mécanismes d'activation de MET différents (amplification de MET, surexpression et mutations du récepteur ou surexpression du ligand HGF). La prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, la croissance en absence d'ancrage, la migration, l'invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse seront analysées par différentes techniques de biologie cellulaire avec ou sans inhibiteur de MET (TKI, anticorps bloquant). Dans un deuxième temps, la pertinence des réponses observées *in vitro* sera validée *in vivo* par l'étude du potentiel tumorigène et métastatique des modèles cellulaires construits dans des souris immunodéficientes. Le modèle murin est le plus approprié pour étudier la tumorigenèse qui nécessite des interactions complexes cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire et diverses stimulations ne pouvant être récapitulées *in vitro*. De même, la capacité des tumeurs à former des métastases ne peut être étudiée qu'au sein d'un organisme complet. Ces études seront réalisées dans deux génotypes murins, la souris immunodéficiente SCID et une souris immunodéficiente humanisée (STOCK Hgf(tm1.1(HGF)AveoPrkdc(scid)/J) dont le gène murin codant l'HGF, incapable d'activer le récepteur MET humain, a été remplacé par la version humaine.

Les expérimentations envisagées viseront en particulier à : 1) Comparer à la lignée parentale EGFR-mutée les propriétés tumorales et métastatiques des lignées dont la voie HGF/MET est activée. 2) Etablir l'influence de l'HGF stromal sur le développement et/ou la métastase des lignées étudiées. 3) Tester l'efficacité de nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinases pour réduire l'agressivité tumorale induite par l'activation de MET lors de la résistance au TKI-EGFR. Ce travail devra permettre de mieux appréhender le rôle apporté par la signalisation du récepteur MET dans la résistance aux TKI-EGFR. Ainsi, le projet permettra de réaliser : - l'étude du potentiel tumoral et métastatique des 5 modèles cellulaires d'activation du récepteur MET (272 souris génotype SCID)

- l'étude de l'efficacité des 3 inhibiteurs choisis (540 souris génotype SCID) - l'étude du rôle de l'HGF stromal sur le développement tumoral, métastatique et l'efficacité des traitements (802 souris génotype KI-HGF) Le projet demandera au maximum 812 souris du génotype SCID et 802 souris du génotype KI-HGF sur une durée de 5 ans (soit < 323 souris/ an).

Le nombre d'animaux est calculé a minima par rapport à l'effectif nécessaire pour une exploitation statistique des résultats. Ce nombre pourra considérablement diminuer car l'efficacité des inhibiteurs ne sera évaluée que dans les modèles cellulaires pour lesquels des différences significatives de croissance tumorale et/ou métastatique auront été mises en évidence. Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous veillerons à limiter au maximum le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation du projet et les animaux seront transplantés avec des cellules tumorales uniquement après que des expériences préalables aient été réalisées *in vitro*. De plus, lorsque l'expérience le permettra, des plans d'expériences comprenant plusieurs traitements seront envisagés pour éviter la multiplication des lots de témoin. Les animaux seront anesthésiés avant chaque intervention afin d'éviter toute souffrance ou stress et nous appliquerons des points limites en cas de gêne ou souffrance manifestées. Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi et assidûment suivies en cours d'expérimentation.

12966 Les insectes, comme les puces et les punaises hématophages, mais aussi les moustiques, sont responsables de la transmission d'un grand nombre d'agents pathogènes bactériens, viraux ou parasites, en particulier dans les régions tropicales. Les punaises sont un grand groupe d'insectes qui comprend les punaises de lit présentes partout dans le monde, mais aussi les punaises géantes d'Amérique, de la sous-famille Triatominae, bien connues pour transmettre le parasite responsable de la maladie de Chagas (à l'origine de milliers de décès chaque année). Les punaises de lit, comme les puces, ont plutôt été associées à la transmission des agents bactériens du genre Bartonella. Ces bactéries, qui infectent les humains et les animaux, sont à l'origine de plusieurs manifestations cliniques dont des endocardites sévères. Bien longtemps après la description de la première bartonellose en Amérique du Sud, beaucoup d'espèces de bartonelles ont été décrites dans le reste du monde ainsi que leurs pathologies associées. Curieusement, peu de travaux ont été conduits concernant les bartonelles d'Amérique du Sud. Or, ces rares projets ont permis de mettre entre autres en évidence deux bartonelles pathogènes, Bartonella ancashensis, qui provoque la même pathologie que Bartonella bacilliformis (agent de la verruga peruana, la toute première bartonellose décrite) et Bartonella rochalimae, une bartonelle associée aux puces qui provoque des endocardites chez le chien. A ce jour, aucun mode de transmission n'est proposé pour ces bactéries bien qu'il soit supposé vectoriel (par les arthropodes). Bartonella rochalimae a déjà été fréquemment détectée dans des puces et des travaux récemment publiés ont montré qu'une bartonelle très proche de Bartonella ancashensis était retrouvée dans les punaises.

Nous souhaitons donc explorer l'hypothèse que ces deux bartonelles, B. rochalimae et B. ancashensis, puissent être transmises à des animaux par les puces et punaises. La connaissance du vecteur de ces bactéries pourra permettre une lutte plus efficace en amont de l'infection. L'étude du rôle vecteur d'un insecte nécessite cependant de démontrer un certain nombre d'étapes cruciales du cycle vectoriel comme l'acquisition du pathogène par l'insecte mais aussi sa capacité à le transmettre à un hôte de façon viable et apte à induire une pathologie. Pour cette raison, il n'est pas possible de remplacer un modèle animal par un modèle *in vitro*.

Des rats d'élevage destinés à la recherche animale seront utilisés pour ce projet. Deux ou trois rats, ce qui correspond au nombre minimum d'animaux pour atteindre les objectifs de l'étude, seront utilisés par modèle (punaises de lit, punaises géantes et puces) pour montrer l'acquisition puis la transmission de la bactérie. Chaque modèle sera effectué en double dans un objectif de confirmation (28 rats au total pour ce projet). Concernant l'enrichissement, les rats seront hébergés en groupe dans des cages contenant plusieurs dômes, tunnels et éléments à ronger. Les animaux seront hébergés et manipulés en animalerie A2. Ils seront visités chaque jour par le responsable scientifique du projet et ne seront manipulés que par du personnel formé. Les piqûres de puces et punaises sont indolores chez l'homme en raison du fort pouvoir anesthésiant de leur salive et ne devraient être à l'origine d'aucune douleur pour les animaux de ce projet. Toutefois, les

manifestations de la douleur seront suivies rigoureusement grâce à une grille d'évaluation (grille de Morton et Griffiths 1985) et tout signe de douleur entraînera l'arrêt de la procédure.

12967 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une étude précédente, l'analyse du microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence un genre bactérien particulier : *Porphyromonas*. Ce genre bactérien, et plus particulièrement *Porphyromonas catoniae* (PC), semble être prédictif de l'infection à PA. Il a été montré chez ces patients, que ceux qui avaient moins de *Porphyromonas* dans les poumons, avaient plus de risque de se coloniser à PA (Keravec et al., BMJ ORR 2019). Par la suite, il a également été montré que la quantité de PC pulmonaire venait à diminuer, voire disparaître, préalablement à la colonisation à PA alors que PC restait stable chez les patients non colonisés. Lors d'une DAP précédente (N°19246-2019021412047910), nous avons pu observer une diminution significative de la quantité de PA 24h et 48h post infection lors d'une instillation préalable de *Porphyromonas*. Nous souhaitons confirmer ces résultats. Pour cela, l'étude proposée se déroulera de la manière suivante : les souris recevront une première instillation par voie intranasale de PC ou de sérum physiologique. Cette instillation est préventive à l'infection à PA également administré de manière intranasale 18 heures plus tard. Nous utiliserons 42 souris afin de mener à bien cette expérimentation. La quantité résiduelle de PA sera analysée par culture bactérienne, sur milieu en boîte de Pétri, de manière à pouvoir comptabiliser le nombre de bactéries vivantes et cultivables restantes dans le poumon aux différents temps post-infection (24H et 48h).

L'objectif est de confirmer un potentiel effet probiotique de PC vis-à-vis de PA.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet une seule espèce de *Porphyromonas* a été sélectionnée grâce aux analyses précédentes réalisées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (retrait du groupe contrôle sérum physiologique-sérum physiologique) (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (anesthésie préalable des animaux avant toutes procédures expérimentales ainsi que l'utilisation de lampes chauffantes) (principe de raffinement).

12968 Dans le cerveau, le système endocannabinoïde (le système par lequel agit le cannabis) a un rôle majeur dans la modulation de l'apprentissage et de la mémoire. Nous avons récemment montré que ce système affecte aussi la production d'énergie dans la cellule et que ce processus est essentiel pour la mémoire. Maintenant, nous voulons confirmer ces résultats dans un modèle génétique qui est essentiel pour approfondir ces études. Le projet a pour finalité une meilleure compréhension du système endocannabinoïde qui pourrait permettre la mise en place de nouvelles et de meilleures cibles thérapeutiques. La durée de ce projet sera de 5 ans. Il est essentiel d'utiliser des souris car nous voulons étudier des mécanismes et circuits neuronaux conservés chez les mammifères y compris l'homme. Ainsi, l'usage des invertébrés qui ont un système nerveux complètement différent serait inapproprié. Pour caractériser ce nouveau modèle génétique nous allons utiliser 2685 souris avec différentes méthodologies comme des tests comportementaux de mémoire, l'analyse d'expression de protéines ou l'électrophysiologie *in vivo*. D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement):

Remplacement: Certaines expériences ont déjà été faites *in vitro* en utilisant des méthodes alternatives (cultures cellulaires *in vitro*, modélisation *in silico*).

Reduction: Les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 15 animaux c'est à dire le nombre minimal d'échantillons permettant l'application de tests statistiques

classiques dans le domaine. Les nombres avancés permettent de garantir une bonne interprétation des résultats. Néanmoins, si l'expérience nous montre que les échantillons peuvent être réduits, ces nombres seront réduits en conséquence.

Raffinement: Les animaux sont observés quotidiennement par un personnel qualifié. : Afin de raffiner les conditions d'utilisation des animaux inclus dans l'étude, les cages d'hébergement seront enrichies de matériel de nidification, et le bien-être de l'animal sera suivi quotidiennement au cours de l'étude. La mise en place des points limites chez l'animal repose sur une évaluation comportementale des animaux. Ils seront observés chaque jour et sacrifiés s'il y a l'apparition d'un point limite bien précis.

Dans le cas de procédures chirurgicales, des protocoles corrects d'anesthésie et d'analgésie seront appliqués et les animaux seront suivis quotidiennement pour s'assurer de la récupération complète post opératoires mais seront mise à mort dans le cas où ils atteignent les points limites.

12969 Les protocoles d'infections expérimentales, régulièrement utilisés par les scientifiques, sont présentés aux comités d'éthique avec l'affirmation que les analgésiques et antalgiques couramment utilisés (morphiniques, anti-inflammatoires, etc...) ont des effets sur la mise en place de l'infection, sur les mécanismes immunitaires associés et d'autres mécanismes comme la dispersion de l'agent pathogène dans l'hôte. Or, l'impact de ces infections sur les animaux est parfois sévère et conduit à des tableaux cliniques dramatiques (prostration, hyperthermie de longue durée, déshydratation, voire mortalité). Certains scientifiques, concepteurs de ces projets d'infectiologie, souhaitent optimiser le déroulement de leurs expérimentations et en augmenter l'acceptabilité dans le respect de la réglementation en expérimentation animale. L'objectif serait d'utiliser un médicament, le paracétamol, analgésique et anti pyrétique reconnu dans l'espèce humaine mais peu utilisé chez les animaux. Ses effets et son innocuité sont cependant très mal connus. Ses conséquences sur la physiopathologie, sur les réponses immunitaires et comportementales sont à déterminer.

Il existe deux possibilités d'utilisation de ce médicament : du paracétamol vétérinaire et du paracétamol pédiatrique. Nous allons comparer ces deux formulations en termes d'efficacité, d'appétence et d'effets secondaires éventuels. Nous utiliserons le modèle expérimental murin sans infection pour étudier l'impact cytotoxique du paracétamol (organes cibles : foie, reins, rate et estomac) à doses répétées par voie orale soit par gavage en dose unique par jour soit par prise spontanée (réflexe naturel de la souris).

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 144 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Il n'y a pas de modèles *in vitro* alternatifs pour mesurer l'effet cytotoxique sur tissus.

– Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature, les premières données expérimentales obtenues et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

- Raffinement : Les souris seront hébergées en animalerie confinée en atmosphère contrôlée, à raison de 3 souris par cage et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou tunnel à ronger). Un maximum d'analyses sera effectué sur chaque animal (sérologique, comportementale, histologique). Les animaux seront suivis plusieurs fois par jour.

12970 Objectif du projet: Au cours du développement préclinique d'un candidat médicament, un grand nombre d'études *in vitro* / *ex vivo* sont effectuées en amont de l'expérimentation animale afin de mieux caractériser un candidat médicament sur son mécanisme d'action et sur le plan toxicologique ou encore de son efficacité. Ces études sont une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de réaliser des études chez l'animal.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. Le but est de réaliser différents prélèvements de fluides biologiques, d'organes et/ou tissus chez le rongeur (rat, souris, hamster, cobayes) et le lapin afin de les utiliser pour des tests *in vitro* / *ex vivo* permettant ainsi une meilleure connaissance toxicologique et pharmacologique du candidat médicament. Ces prélèvements, et plus

particulièrement ceux dérivés du sang, s'avèrent également nécessaires lors du développement de méthodes analytiques (ex : hémato-biochimie).

Ceci aura pour conséquence de limiter l'utilisation directe d'animaux en expérimentation et, qui plus est, dans des procédures peu invasives et peu douloureuses. Ce projet s'inscrit ainsi dans le cadre des 3R.

Dommmages escomptés: Il n'y a pas de dommmage escompté dans le cas de prélèvement sanguin unique.

Dans le cas de prélèvements sanguins répétés, effectués selon les recommandations du GIRCOR, une attention particulière sera apportée au niveau des sites de prélèvement afin d'éviter tout point de nécrose pouvant entraîner une douleur chez l'animal. Dans le cas de prélèvements d'urine ou de fécès, les animaux seront hébergés individuellement dans des cages à métabolisme, sur grille. De ce fait, le confort de l'animal est altéré, d'où une attention particulière qui sera portée sur l'état général de l'animal. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode de prélèvement permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Ce projet correspond à une seule procédure qui représente elle-même une méthode alternative de choix. In fine, la mise en place de ces études *in vitro* / *ex vivo* se traduira par une réduction du nombre d'études vivo et donc d'animaux inclus.

Nombre et type d'animaux : principe de réduction

Choix des espèces: Les espèces rats, souris, hamster, cobayes et lapins seront utilisées en raison de l'abondance de littérature, de l'existence des outils d'analyses adaptés à ces espèces (exemple : Anticorps, protéines, sonde ADN...).

Nombre d'animaux: Sur 5 ans, il est estimé à 2400 rongeurs (600 de chaque espèce) et 150 lapins. Le nombre d'animaux sera modulé en fonction du nombre de manipulations expérimentales réalisées dans l'année.

Cependant, il sera fait en sorte de ne pas utiliser plus de 30 rongeurs ou 10 lapins par étude dans le but de rationaliser le nombre d'animaux utilisés.

Conditions d'hébergement et de soins: principe de raffinement

Les conditions d'hébergement, d'enrichissement et de soins ont été choisies de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne (Directive 2010/63) en vigueur. La stratégie d'enrichissement est établie afin de permettre à l'animal de reproduire au mieux son environnement naturel et est régulièrement revue/mise à jour. Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

12971 Les ganglions de la base (GB) sont un ensemble de structures cérébrales qui ont un rôle crucial dans la mise en place des actions motrices que nous entreprenons quotidiennement, mais le mode de fonctionnement exact de ces circuits pendant un mouvement est loin d'être connu. De plus, le dysfonctionnement de ces boucles entraîne des maladies motrices graves qui affectent non seulement la capacité d'initier une action (comme c'est le cas dans la maladie de Parkinson) ou au contraire l'impossibilité de supprimer des mouvements involontaires (comme ceux présents dans les dyskinésies induites par la prise de levodopa pour traiter la maladie de Parkinson).

L'objectif principal de ce projet de recherche est de comprendre le rôle des GB dans l'exécution d'un mouvement normal en situation physiologique ou à l'inverse dans la genèse des mouvements anormaux en situation physiopathologique. Nous étudierons deux situations physiopathologiques extrêmes que sont : la maladie de Parkinson (dans laquelle il est difficile d'initier un mouvement volontaire), ou la situation inverse décrite par l'état dyskinétique (dans lequel il est difficile de supprimer un mouvement involontaire). La principale nouveauté de ce projet de recherche repose

sur l'utilisation d'une approche dite 'optogénétique' qui permet de manipuler à l'aide d'une lumière laser l'activité électrique des neurones ciblés afin d'en définir leurs rôles causaux.

Pour mener à bien ce projet de recherche nous utiliserons des rats de type Long Evans sauvages (150 rats) et des rats transgéniques (150 rats FoxP2-Cre). Les rats transgéniques présentent un avantage réel car ils permettent un ciblage optogénétique précis pour manipuler certaines sous-populations neuronales des GB inaccessibles chez des animaux non modifiés génétiquement. Ces animaux seront soit utilisés dans leur état contrôle (condition physiologique sans traitement) ou dans un état physiopathologique qui modélise la maladie de Parkinson chez le rongeur avec ou sans induction de dyskinésies. Les expériences que nous effectuerons chez ces animaux sont basées sur une approche pluridisciplinaire qui combine manipulations optogénétiques et enregistrement électrophysiologiques *in vivo* en situation comportementale. La tâche motrice que nous utiliserons consiste en un mouvement volontaire de type appuie sur un levier. Pour finir, la règle des 3 'R' (Réduire, Raffiner, et Remplacer) sera appliquée comme base fondamentale de notre approche éthique dans ce projet.

Justificatif du respect de la règle des 3R: Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des circuits neuronaux impliqués dans l'acte moteur volontaire nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez un animal vigile. Des méthodes *in vivo* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connections neuronales nécessaires pour la réalisation de ce projet. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire: le nombre d'animaux a été calculé afin d'atteindre une puissance statistique suffisante en fonction des effets attendus et de la variance de notre échantillonnage. Ce nombre est donc de 75 rats par groupe expérimentale, soit un total de 300 animaux pour la réalisation de ce protocole. Raffiner: les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. Lors de la partie comportementale, les animaux sont manipulés quotidiennement par l'expérimentateur pour diminuer leur niveau de stress lors des tests. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances prolongées aux animaux avec des mesures de soulagement mis en place (réhydratation, réchauffement, et traitements vétérinaires si nécessaire).

12972 Justification : La carcinose péritonéale (métastases du péritoine) est une complication fréquente des pathologies cancéreuses évoluées. 12% des patients ayant un cancer colorectal sont porteurs d'une carcinose péritonéale au moment du diagnostic, ce chiffre pouvant atteindre 25% lors de l'évolution de la maladie. Plusieurs équipes ont mis au point l'association de la chimiothérapie intrapéritonéale (avec ou sans hyperthermie) à une chirurgie pour traiter efficacement la carcinose d'origine colorectale. Néanmoins, même si ces thérapeutiques sont devenues des standards dans les centres experts, deux problèmes de pharmacocinétique semblent limiter l'efficacité de la chimiothérapie intrapéritonéale : l'exposition incomplète ou parfois insuffisante de la séreuse digestive aux principes actifs, et la pénétration intra-tumorale qui est parfois limitée en rapport avec la structure de la tumeur. Ainsi depuis quelques années, certaines équipes ont développé une chimiothérapie sous forme d'aérosol. La chimiothérapie à l'aérosol intra-péritonéale pressurisée (PIPAC) est une nouvelle technologie pour administrer une chimiothérapie intrapéritonéale et traiter les patients souffrant de carcinose péritonéale avancée. Le médicament de chimiothérapie liquide est délivré au moyen d'un injecteur haute pression et d'une ligne haute pression grâce à une pompe brevetée (Chimiothérapie intrapéritonéale à l'aérosol sous pression ou PIPAC). Néanmoins, le suivi pharmacocinétique de deux chimiothérapies intra péritonéales sur modèle animal dans ces études préliminaires est très restreint. Le traitement a été instauré de façon empirique, et aucune étude comparative de la pharmacocinétique des différents modes d'administration n'a comparé de façon prospective sur un modèle animal ces deux techniques. Il est impératif d'obtenir des données

pharmacocinétiques détaillées et systématiques des deux modalités de traitement afin d'optimiser les soins aux patients. Cette étude sera la première étude du genre. Moyens : Nous réaliserons une étude comparative entre 2 groupes de 8 animaux avec utilisation des deux principes actifs couramment utilisés en oncologie en Europe (la doxorubicine et l'oxaliplatine). Ces deux groupes de 8 porcs seront subdivisés en deux autres groupes de 4 cochons traités soit par CHIP (chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale) classique soit par PIPAC. Des mesures au niveau de la paroi abdominale et intestinale seront effectuées. Les mesures de pénétration tissulaire entre chaque région abdominale et chaque type de traitement de chimiothérapie, CHIP et PIPAC, seront comparées. Parallèlement, les dosages sanguins du passage systémique des drogues seront effectués et comparés entre CHIP et PIPAC. Résultats attendus : Montrer que les modalités d'administration et la localisation de la pompe administrant les produits ne permettent pas toujours une diffusion homogène dans la paroi. Ces résultats permettront de mettre en exergue l'absence d'homogénéité de la répartition des drogues dans les tissus en fonction des modalités administrations (CHIP, PIPAC, localisation de la pompe d'insufflation des produits). Ces résultats seront tout de suite applicables à l'humain en modifiant le dosage des drogues, en évaluant aussi le risque de surdosage par le passage systémique, grâce à nos mesures dans cette étude qui sera la première du genre.

Nous avons respecté le principe des 3R comme suit :

Remplacement : Nous ne pouvons comparer la diffusion des drogues dans un modèle *ex vivo*, l'utilisation d'un modèle animal est indispensable. Nous avons choisi le modèle porcin du fait de ses nombreuses similitudes anatomiques avec l'Homme.

Réduction : nous avons limité le nombre d'animaux au plus juste pour avoir des résultats statistiquement exploitables. Nous utiliserons 16 animaux.

Raffinement : les animaux seront dans des cases spacieuses contiguës avec des parois ajourées permettant le contact visuel entre les animaux. Durant l'expérimentation, ils seront placés sous anesthésie générale et recevront un traitement analgésique tout à long de l'expérience. Il n'y a pas de réveil des animaux, l'euthanasie par surdosage barbiturique se déroule sous anesthésie.

12973 Le traitement chirurgical des anévrysmes de l'aorte thoraco-abdominale nécessite un clampage des artères à destination viscérale et induit une ischémie-reperfusion (I-R) mésentérique. Cette chirurgie se complique fréquemment d'une réponse inflammatoire systémique entraînant une atteinte pulmonaire et parfois une défaillance multiple d'organes. Différents modèles expérimentaux démontrent la place importante de la dysfonction endothéliale dans l'I-R mésentérique. Le glycocalyx endothélial pourrait être un acteur majeur du phénomène. Le glycocalyx recouvre l'endothélium et se situe à l'interface avec le sang. Ses produits de dégradation, en rapport avec l'activité héparanase, sont à l'origine de syndromes inflammatoires systémiques rencontrés dans des circonstances pathologiques graves comme le sepsis. Une étude récente a montré l'intérêt pronostique de l'activité héparanase au cours de la chirurgie des anévrysmes de l'aorte thoraco-abdominale.

Le but de notre projet est d'explorer la voie du glycocalyx et l'activité héparanase comme lien de causalité entre l'ischémie viscérale liée au clampage de l'aorte supra viscérale et la survenue de défaillances d'organes en particulier de l'atteinte pulmonaire et rénale. Nous proposons de garder le modèle expérimental chez le rat de clampage de l'aorte supra coeliaque (60mn) connu de notre laboratoire.

Lors d'une première approche nous ferons une étude de l'activité héparanase avant le clampage, à 6h et à 48h (avec un groupe contrôle) : (4 groupes de 10 rats)

- Dosages sanguins de l'héparanase et du syndécan 1

- Mesures tissulaires de l'héparanase : intestin, poumons et rein en immunohistochimie et en PCR.

Aux mêmes dates de mise à mort nous ferons une étude de l'activité inflammatoire :

- Dosages sanguins de TNF, IL1 et IL6 en Elisa

- Mesures tissulaires en immunohistochimie de TNF, IL1, IL6 et neutrophiles sur intestin, poumons et reins.

Lors d'une deuxième approche nous travaillerons sur la survie des animaux ayant subi un clampage de l'aorte supra coeliaque et nous testerons un traitement par héparine non fractionnée ou par héparine de bas poids moléculaire (avec un groupe contrôle et 2 doses pour chaque traitement) (5 groupes de 10 rats). L'activité sérique héparanase sera dosée à différents temps 6 heures et 48 heures chez les survivants selon les résultats de la première partie.

Le projet portera donc sur 90 rats au total. (1ère approche, n=40 et 2nde approche, n=50)

Le projet est en accord avec le respect des règles 3R:

Raffinement: les animaux auront 1 semaine d'adaptation, dans des locaux non surpeuplés, avant les interventions de clampage coeliaque. Ils seront deux par cage avec un accès ad libitum à l'eau et à l'alimentation qui seront quotidiennement vérifiés par un personnel expérimenté. La propreté des litières (languettes de papier) sera quotidiennement vérifiée et changée par un personnel expérimenté de manière systématique 2 fois par semaine et plus si besoin. Après une période d'acclimatation d'une semaine associée à un contact quotidien avec l'expérimentateur, les interventions auront lieu dans une pièce isolée, calme, avec ce seul et même expérimentateur.

Analgesie: Nous injecterons 1 heure avant l'intervention en sous-cutanée (SC) 0,05mg/kg de Buprénorphine. De plus, nous appliquerons 10 minutes avant l'incision sur la peau de la lidocaine gel 1% suivi d'une anesthésie intra péritonéale par Kétamine (20mg/kg) et Xylazine (0,5mg/kg). L'analgesie post opératoire sera poursuivie par une surveillance biquotidienne de la douleur du rat et motivera des injections systématiques SC de Buprénorphine 0,01 à 0,05mg/kg toutes les 8 heures durant les 24 premières heures. Ensuite, les injections de buprénorphine SC de 0,01 à 0,05mg/kg se feront selon l'échelle de douleur faciale de la NC3Rs et répétés toutes les 8 heures si nécessaire. Enfin, des points limites adaptés seront évalués biquotidiennement.

Réduction: Nous optons pour des études chez des espèces d'animaux élevés à des fins scientifiques, caractérisés par une faible variation génétique entre individu, ce qui conduit à une moindre variabilité de la réponse biologique ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés. Le nombre d'animaux nécessaire a été calculé en fonction des données sur le métabolisme du glycocalyx ainsi qu'à l'aide d'un test de Student (Test T) unilatéral afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Remplacement: ce projet ne peut pas faire l'objet de remplacement par d'autres modèles expérimentaux n'impliquant pas d'animaux vivants, devant la complexité de la physiopathologie de l'ischémie reperfusion viscérale.

Le résultat attendu étant une amélioration de la survie lors des traitements corrélés à la prévention de l'activité héparanase. Les perspectives de ce travail sont de comprendre les mécanismes de l'agression pulmonaire et rénale au cours de cette chirurgie, de rechercher un biomarqueur préopératoire pronostique de survenue de complications post opératoires et de rechercher des voies de prévention.

12974 Le syndrome métabolique, pour lequel l'incidence dans les pays occidentaux est en constante augmentation, est défini par un ensemble de critères (plusieurs troubles de santé d'origine lipidique, glucidique ou vasculaire associés à un excès de poids chez un même individu), à l'origine d'un état d'inflammation chronique. Ses manifestations hépatiques réalisent un ensemble de lésions dues au dysfonctionnement métabolique qui devient le principal facteur de risque de maladie chronique du foie dont l'évolution terminale est la cirrhose. Mais aussi, il est clairement établi que ce syndrome favorise le développement des cancers hépatiques dont le cancer des voies biliaires est le deuxième le plus fréquent. Le pronostic de ce cancer est sombre, du fait de son fort potentiel à faire des métastases à distance. Il n'existe à ce jour aucune étude montrant un modèle pré clinique *in vivo* de cancérogenèse dans ce contexte de syndrome métabolique. L'objectif de notre étude est de réaliser un modèle de souris obèses ayant reçu un régime riche en gras et un modèle de souris ayant reçu un régime normal, puis d'injecter à toutes les souris des cellules cancéreuses dans le but de comparer l'évolution tumorale en fonction du régime.

Dans la prise en charge thérapeutique actuelle, la chirurgie de résection du cancer est le traitement standard, mais malheureusement, du fait du caractère très agressif des tumeurs, elle est rarement réalisable. Nous testerons 3 molécules dans notre étude, pour comparer leur efficacité, et identifier lesquelles seraient plus appropriées dans ce contexte. Les traitements seront: la metformine, un antidiabétique oral qui a montré des effets bénéfiques *in vitro* et *in vivo* sur plusieurs cancers, aussi un inhibiteur d'une petite protéine permettant le transport intracellulaire des acides gras qui est augmentée chez les patients obèses, ayant été testé *in vitro*, et l'association gemcitabine-cisplatine, la chimiothérapie la plus utilisée actuellement, mais n'ayant qu'un effet thérapeutique modeste. Les traitements seront injectés en intra-péritonéal 2 fois par semaine pendant 4 semaines.

Les animaux seront particulièrement surveillés pendant toute la durée du protocole, tous les deux jours. L'injection des cellules tumorales sera réalisée sous anesthésie générale, au cours d'une courte chirurgie par voie abdominale, directement dans le foie, et l'administration d'antalgique est prévue en cas de douleurs ou d'angoisse de l'animal tout au long de l'expérimentation. La procédure chirurgicale sera d'environ 10 minutes, puis les animaux seront réintégrés dans leur cage et surveillés. Des points limites et une grille d'évaluation ont été établis, si les points limites sont atteints, l'animal sera euthanasié.

Le nombre d'animaux nécessaire est évalué à 90 souris pour une période d'environ 8 mois. Après l'euthanasie de toutes les souris en fin de protocole, un prélèvement d'organe sera effectué, pour faire une analyse des tumeurs. Ces analyses seront comparées en fonction des régimes, mais aussi de la réponse tumorale aux traitements testés. Cela permettra aussi de comparer le foie non tumoral. En conformité avec la loi des 3R (réduction, remplacement, raffinement), plusieurs mesures seront mises en place.

Pour le remplacement: les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes, compte-tenu de la complexité de la cancérogenèse dans ce contexte de diminution de la sensibilité à l'insuline. Ce modèle permettrait d'étudier le cancer hépatique dans son environnement et ses interactions avec les différentes cellules qui l'entourent, notamment les cellules des vaisseaux sanguins qui jouent un rôle important dans le développement tumoral. Des études *in vitro* ont été réalisées en amont, qui compléteront ce volet d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer.

Pour la réduction, 2 lots de 45 souris opposant le régime normal au régime gras seront divisés en 3 groupes chacun en fonction du traitement, sachant que toutes les souris auront reçu une greffe de cellules tumorales intra-hépatique pour réduire le nombre de souris, car le taux d'implantation tumoral peut varier. Les souris ne développant pas de tumeurs seront euthanasiées 2 semaines après l'injection.

Pour le raffinement: les méthodes et mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie générale sera effectuée lors des procédures douloureuses et l'utilisation d'antalgique sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur tout au long de l'expérimentation. Une grille avec un score de souffrance de l'animal et des points limites ont été définis, de manière adaptée au projet, afin d'éviter toute souffrance inutile.

12975 Le but de ce projet est de former et de maintenir les compétences et les connaissances des expérimentateurs pour la réalisation de prélèvement sanguin et/ou d'administration de qualité chez la souris, afin d'impacter au minimum le confort des animaux. Cette formation/maintien des compétences s'adresse aux concepteurs et aux personnels appliquant des procédures en expérimentation animale détenteur du niveau correspondant. Les techniques concernées seront l'administration d'un composé par voie sous-cutané (SC), intrapéritonéale (IP), intraveineuse (IV), orale (gavage) et les prélèvements sanguins (rétro-orbital, ponction cardiaque), chez la souris. Les animaux utilisés dans ce projet seront des animaux de réforme issus des élevages et pourront être complétés, si nécessaire, par des animaux commandés chez des éleveurs/fournisseurs agréés. Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 980 souris maximum sur 5 ans.

Conformité/exigences des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) :

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la répétition des gestes expérimentaux dans le respect des volumes tolérés.

Pendant toute la période précédant la mise en œuvre du projet, les souris seront hébergées à 2-5 par cage avec un minimum de 2 enrichissements de milieu. Dans la mesure du possible, les animaux utilisés ne seront pas commandés spécialement pour la procédure mais issus d'élevages et destinés à l'euthanasie.

Les techniques d'administration d'un composé chez la souris seront pratiquées sur animaux vigiles, dans le cadre d'une procédure de classe légère, sauf dans le cas de l'injection par voie IV en rétro-orbital. Cette dernière ainsi que les techniques de prélèvement sanguin chez la souris seront réalisées dans le cadre d'une procédure de classe sans réveil, dans laquelle les animaux seront anesthésiés (anesthésie générale), analgésiés (analgésiques centraux) et mis sur tapis chauffant durant la totalité de la procédure. Ces derniers seront euthanasiés en fin de procédure.

12976 La prévalence rapportée du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) et des problèmes d'infertilité féminine chez les femmes en âge de procréer varie de 6 à 20%, en fonction des critères de diagnostic utilisés pour définir le syndrome. Plusieurs facteurs interdépendants contribuent aux caractéristiques cliniques des problèmes d'infertilité SOPK, ce qui contribue à expliquer la grande variabilité de la présentation clinique du SOPK. Ces facteurs comprenaient l'excès d'androgènes, l'hypersécrétion d'hormone lutéinisante (LH) et la dynamique anormale de la sécrétion d'hormone stimulant le follicule (FSH) et la résistance à l'insuline, caractéristiques que nous retrouvons chez nos souris mutées pour le Récepteur des oestrogènes ER α . De plus, l'induction de l'ovulation par des anti-œstrogènes ou des inhibiteurs de l'aromatase a été utilisée avec une certaine efficacité. Au laboratoire, nous disposons de modèle de souris transgéniques, exprimant des isoformes mutées du récepteur des oestrogènes ER α qui sont infertiles et qui développent des dysfonctions ovariennes, proches du syndrome des ovaires polykystiques chez la femme. Dans ce contexte, l'étude des souris transgéniques mutées pour ER α s'avère être un modèle de choix pour comprendre le rôle d'ER α à l'origine de ces infertilités.

Dans ce projet, nous nous proposons donc de greffer les ovaires dysfonctionnels provenant des souris mutées pour ER α à des souris sauvages et vice versa avant d'étudier ensuite la fertilité de ces souris (accouplement avec des mâles, et suivi échographique de la gestation).

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux dans ce projet a été réduit à son minimum, à savoir l'utilisation de 210 souris. Il a été impossible de remplacer l'expérimentation animale par des tests en culture de cellule, puisque la reproduction met en jeu des mécanismes de régulation complexes en physiologie et les dialogues inter-organes entre l'ovaire et le cerveau en particulier. Les expériences de chirurgie de greffes ovariennes seront réalisées sous anesthésie, et optimisées afin de minimiser la souffrance animale. Nous mettrons fin à l'expérimentation si des signes cliniques révélateurs de dommages sont détectés.

12977 Notre société, prestataire de services en recherche préclinique, développe des modèles de recherche et propose un large panel de modèles *in vivo* adaptés pour des études de pharmacocinétique, de pharmacologie, d'évaluation de l'efficacité des composés thérapeutiques et pour la recherche translationnelle.

L'objectif de ce projet de recherche est de développer de nouveaux modèles expérimentaux les plus prédictifs possible afin de mimer les pathologies humaines et de tester sur ces modèles de nouvelles thérapies anticancéreuses. Dans les procédures réalisées sur les modèles animaux de cancers, les composés seront évalués dans un environnement physiologique. Cependant, les résultats de ces études ne sont pas toujours transposables à l'homme.

Pour cette raison, nous avons développé des modèles expérimentaux de souris et de rats. Une première approche consiste à xénogreffer des cellules cancéreuses ou des fragments de cancers humains directement obtenus à partir de patients, sur des animaux immunodéficients. Ces cellules ou fragments cancéreux seront soit greffés en sous-cutané, soit directement placés dans un tissu cible de la tumeur pour mieux simuler l'environnement originel du cancer. Une seconde approche

consiste en l'utilisation de d'agents carcinogènes tels que la DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) afin d'induire des tumeurs mammaires. Quel que soit le modèle utilisé, les animaux seront traités avec de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. Les animaux seront suivis individuellement et ils seront obligatoirement euthanasiés aux points limites définis dans chaque procédure.

Ces modèles permettent de mieux évaluer l'efficacité des molécules destinées à traiter les cancers chez l'homme.

Durant les cinq années de ce projet, nous allons utiliser 125000 animaux soit 105000 souris et 20000 rats.

Ces animaux seront utilisés dans sept procédures multiples au cours desquelles seront évalués différents médicaments :

- Toxicité, pharmacodynamique, pharmacocinétique de composés thérapeutiques chez le rongeur porteur ou non de tumeur
- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée en sous cutané
- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée chirurgicalement dans différents organes cibles de la tumeur (greffe orthotopique).
- Évaluation d'efficacité anti-métastatique de composés chez le rongeur porteur de tumeur métastatique (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient)
- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur induites chimiquement par un carcinogène

Dans l'objectif de raffinement, toutes les procédures techniques sur les animaux seront réalisées selon les standards validés par la structure chargée du bien-être animal (fréquence de prélèvements de sang, les méthodes d'administration des composés, ...). Chaque développement de nouveau modèle sera précédé d'une étude pilote. Pendant cette étude les experts (dont le vétérinaire) analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et ils détermineront les points limites ainsi que la stratégie du suivi clinique. Les résultats de ces études seront présentés au comité éthique. D'autre part, pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures, nous allons utiliser des biomarqueurs et des techniques faiblement invasives d'imagerie chez le petit animal.

12978 La Grippe est une infection respiratoire aiguë, contagieuse, due aux virus Influenzae. Il existe 3 types de virus grippaux : A, B et C. Le virus de type C, très rare, ne cause généralement que des infections bénignes. Ceux de type B circulent essentiellement chez l'Homme alors que les virus de type A (H1N1, H3N2...) circulent chez l'Homme ainsi que chez le porc, le poulet et les canards (réservoir primitif de ces virus). Ils peuvent donc se transmettre d'une espèce à l'autre, lors des contacts dans les élevages, et circuler d'un continent à l'autre via les oiseaux migrateurs. Le virus se transmet par les sécrétions respiratoires (éternuements) ou par contact d'objets contaminés. Les lieux confinés et très fréquentés (métro, bus, écoles...) sont propices à sa transmission. La période d'incubation de la maladie varie de 1 à 3 jours. Lors des épidémies annuelles, 5 à 15 % de la population souffre d'infections des voies respiratoires supérieures. Dans les pays industrialisés, la plupart des hospitalisations et des décès dus à la Grippe surviennent dans les groupes à haut risque (personnes de plus de 65 ans, malades chroniques...). On estime que les épidémies annuelles entraînent entre 3 et 5 millions de cas graves et 250 000 à 500 000 décès par an dans le monde. De plus, ces épidémies ont des répercussions économiques considérables en termes d'hospitalisations, de dépenses de santé et de pertes de productivité. Les pandémies provoquées par des virus de type A provoquent un grand nombre de malades et de décès. Contrairement aux épidémies courantes, on a observé lors de ces pandémies des complications graves chez les jeunes adultes en bonne santé.

Des traitements antiviraux existent, mais ils ne permettent de diminuer la durée et l'intensité des symptômes que s'ils sont pris très précocement. Ils sont utilisés essentiellement chez les personnes à risque pour réduire les complications. Dans ce contexte, la vaccination constitue le meilleur moyen de protection contre la Grippe. Mais aujourd'hui, aucun vaccin universel n'est disponible : le vaccin actuellement commercialisé est un vaccin trivalent qui doit être annuellement renouvelé selon les recommandations émises par l'Organisation mondiale de la santé. Ce dernier est élaboré avec les souches qui ont circulé majoritairement durant l'hiver précédent, les plus susceptibles d'être présentes lors de l'hiver suivant. Le manque d'efficacité des vaccins annuels est problématique en termes de santé publique et pourrait se révéler dangereux en cas d'émergence d'un nouveau virus hautement pathogène. Dans ce contexte, de nombreuses équipes de recherche travaillent sur de nouveaux modèles de vaccins (ARN, ADN, protéiques...) dans le but de trouver un vaccin « universel » pouvant protéger contre un grand nombre de souches sans rappel chaque année. Pour tester ces vaccins, il faut alors s'assurer qu'ils soient efficaces contre plusieurs souches virales. Or chaque souche présente ses propres caractéristiques (infectiosité, symptômes...). Il faut donc être capable d'évaluer les symptômes et la réponse immunitaire induite par chaque souche étudiée.

Les objectifs de ce projet sont de développer des modèles d'infection par deux virus de la Grippe chez le macaque, mimant le syndrome grippal humain et, ensuite, d'évaluer l'efficacité de nouveaux « candidats vaccins » en suivant au cours du temps, pendant la phase d'immunisation et après infection par le virus de la grippe, des paramètres biologiques renseignant sur la charge virale et les réponses immunitaires de l'hôte. Le but est d'identifier des vaccins plus efficaces contre un grand nombre de souches virales différentes, incluant notamment le virus H1N1 responsable de la pandémie de 2009. Les retombées de cette étude auront des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme pour combattre les souches virales circulant actuellement et, à plus long terme, pour prévenir l'émergence de nouvelles souches ou d'origine animale. Les stratégies de vaccination étudiées seront comparées au vaccin commercial actuellement utilisé (Vaxigrip®) chez l'Homme.

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Le primate non humain a été choisi car c'est le seul modèle permettant d'avoir un modèle d'infection par le virus de la Grippe comparable à la maladie humaine et une réponse immunitaire et vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme, contrairement au furet par exemple.

Le projet prévoit de tester au minimum 7 vaccin-candidats en comparaison aux vaccins commerciaux et à des contrôles. Pour cela, il est prévu d'utiliser au maximum 196 animaux sur 5 ans, soit environ 40 animaux/an, nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Ce nombre prend en compte les différents scénarios du projet mais tout sera fait pour limiter les groupes expérimentaux : il est attendu que potentiellement, moins d'animaux soient utilisés. De plus, des études pilotes ont été réalisées sur le rongeur pour réduire au maximum les groupes dans ce projet. Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : Les différentes interventions (prélèvements de sang, de fluide nasal, trachéal et broncho-alvéolaire, immunisations, infection expérimentale, imagerie *in vivo*) seront faites sous anesthésie générale. Les volumes sanguins prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection et en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales pendant la phase d'infection (l'état fébrile des animaux n'excédant pas deux semaines après l'infection, hébergement individuel nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus).

Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

12979 Le "One Anastomosis Gastric Bypass" (OAGB) est un type de chirurgie métabolique (bariatrique) qui est actuellement reconnu pour entraîner une nette amélioration de l'équilibre glycémique et une

rémission du diabète de type 2 indépendamment de la perte de poids. Cependant, les facteurs prédictifs de la rémission du diabète de type 2 et de l'amélioration des paramètres métaboliques après chirurgie bariatrique sont encore mal connus. Des études cliniques ne permettent pas pour des raisons éthiques de déterminer clairement les mécanismes physiologiques conduisant à l'amélioration de la fonction des cellules bêta pancréatiques par la chirurgie métabolique dans un contexte de diabète. Les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets métaboliques de cette chirurgie sur le pancréas restent à approfondir dans un contexte de désordre métabolique en utilisant notamment le modèle diabétique porcin. C'est pourquoi, l'objectif du projet est d'élaborer un modèle pré-clinique de porc métabolique mimant le syndrome métabolique des patients obèses opérés par chirurgie bariatrique pour ensuite pouvoir étudier les mécanismes de rémission du diabète de type 2 après chirurgie.

Ces travaux viennent en prolongement d'études réalisées depuis plusieurs années au sein de notre laboratoire chez des porcs non obèses non diabétiques. Afin de pouvoir comparer les résultats avec les études antérieures, il est important de conserver la même espèce. De plus, le modèle pré-clinique porcin offre une grande opportunité du fait de sa proximité avec l'Homme, qu'elle soit métabolique, physiologique, ou encore anatomique, à la différence des modèles rongeurs. En effet, il s'agit d'un grand mammifère permettant la transposition des techniques chirurgicales utilisées en pratique courante chez l'Homme. De plus, son régime alimentaire est omnivore et son métabolisme glucidique est semblable au nôtre. Le miniporc est une souche dont la taille et le poids adulte raisonnables permettent une stabulation moins compliquée que des porcs classiques (300 kg à l'âge adulte), plus lourds chez lesquels il aurait fallu utiliser des individus juvéniles au métabolisme quelque peu différent de l'individu adulte. Ainsi le modèle créé sera un véritable modèle de diabète de type 2 associé à l'obésité le plus proche possible de l'Homme. La mise au point de ce modèle n'est pas aisée, les définitions de l'obésité et de diabète de type 2 chez le grand Mammifère n'étant pas universelles. Cependant les meilleurs éléments qui permettent l'apparition chez le miniporc d'une obésité morbide associée à un syndrome métabolique (hyperglycémie, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie, hypertension artérielle, insulino-résistance) semblent être l'association hyperlipidique et hyperglucidique au cours d'un régime hypercalorique. Nous pratiquerons une pancréatectomie subtotale afin d'obtenir une insulino-pénie accélérant le processus d'apparition de l'insulino-résistance dans un contexte d'obésité pour ensuite provoquer le diabète de type 2. Nous réaliserons des dosages sanguins de différents paramètres métaboliques lors des repas test et IVGTT (Intravenous Glucose Tolerance Test) réalisés chez des animaux vigiles. Des biopsies (foie, tissu adipeux viscéral et sous-cutané, pancréas, muscle) seront effectuées lors de la pancréatectomie ainsi que 3 mois après mise sous régime hypercalorique et lors de la chirurgie métabolique en fin de protocole. Ces dernières permettront de réaliser des western blot (technique de biologie moléculaire qui permet la détection de protéines spécifiques sur une membrane) et de l'immunohistochimie (méthode de localisation des protéines situées dans les cellules d'un tissu par immunomarquage).

Les animaux utilisés dans cette étude seront hébergés individuellement dans une animalerie. Afin de limiter leur nombre, nous serons particulièrement attentifs à leur développement et à leur rétablissement en utilisant des traitements anti-douleurs avant, pendant et après toute chirurgie. De plus, le statut de grand mammifère implique l'utilisation d'un minimum d'animaux ("Réduire") et nous optimiserons leur nombre ("Raffiner") en réalisant un maximum de tests et de prélèvements tissulaires par individu. Cependant nous ne pouvons pas "Remplacer" l'utilisation d'animaux car nous étudions des mécanismes physiologiques. Pour réaliser cette étude, nous estimons donc le nombre d'animaux nécessaires à 24 par an soit 120 porcs sur 5 ans.

Les résultats obtenus permettront une meilleure compréhension des mécanismes de la chirurgie métabolique et éventuellement le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter le diabète de type 2.

12980 De très nombreuses études prospectives montrent que le niveau de consommation des protéines animales des pays les plus riches ne pourra pas se généraliser à l'échelle planétaire en l'état actuel des ressources. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer et/ou promouvoir de nouvelles

sources de protéines alternatives aux protéines animales comme par exemple les protéines d'origine végétale. L'évaluation de la qualité de ces nouvelles sources de protéines est une étape essentielle. La qualité d'une protéine peut se définir par deux critères. Le premier est la capacité de la protéine, et notamment des acides aminés qui la constitue, à être assimilée par l'organisme : c'est ce qu'on appelle la biodisponibilité des acides aminés. Le second est sa capacité à fournir les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines corporelles (comme par exemple les protéines du muscle). Pour évaluer ces critères, il est nécessaire de pouvoir suivre la protéine alimentaire d'intérêt dans l'organisme et notamment, de pouvoir la distinguer des protéines et acides aminés endogènes, sécrétés par l'organisme. Pour cela, les protéines alimentaires sont intrinsèquement marquées avec des isotopes stables, c'est-à-dire n'émettant pas de rayonnement radioactif comme par exemple l'azote ^{15}N et le deutérium ^2H .

Les objectifs de ce projet sont donc d'évaluer chez le rat la biodisponibilité des acides aminés et l'effet sur la synthèse protéique de protéines issues de diverses sources (fraction protéique de légumineuses, de céréales, extraits protéiques de levure, etc.) qui auront été préalablement marquées au ^{15}N ou au ^2H . Pour cela, la protéine à tester sera intégrée à un repas test ingéré par les rats. Des prises de sang à la queue seront réalisées et les urines collectées dans les heures suivant l'ingestion du repas test. Les animaux seront ensuite euthanasiés 6 h après le repas pour collecter les contenus intestinaux ainsi que les organes et tissus d'intérêt. Afin de déterminer le taux de synthèse protéique dans ces différents organes et tissus, les animaux recevront une dose d'un traceur spécifique par injection intraveineuse à la queue (effectuée sous anesthésie gazeuse) avant l'euthanasie.

Nous utiliserons 8 animaux par groupe ce qui est le nombre minimal d'animaux pour avoir une bonne représentation statistique. Pendant les 2 ans du projet, nous envisageons de tester chaque année 6 sources protéiques soit au total 96 animaux (8 animaux/groupe x 6 protéines x 2 ans).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative validée *in vitro* pour déterminer la biodisponibilité des acides aminés. En effet, en l'état actuel des connaissances, les méthodes de digestion *in vitro* ne permettent pas d'obtenir des données représentatives de la biodisponibilité des acides aminés alimentaires mesurées chez l'Homme. Nous devons donc avoir recours aux modèles animaux pour cela. Le rat est un bon modèle car son régime alimentaire et son système digestif présentent des similarités suffisamment importantes avec ceux de l'Homme pour qu'une extrapolation des résultats obtenus soit envisagée.

Il est nécessaire d'héberger les animaux en cages individuelles car nous devons suivre la prise alimentaire et donner un repas test individuel. Les animaux resteront donc durant la totalité du protocole expérimental en cage individuelle (15 jours). Pour réduire le stress pouvant être engendré par ce type d'hébergement, les cages individuelles seront en plexiglas transparent permettant aux animaux de se voir et d'optimiser ainsi les interactions pouvant avoir lieu et seront enrichies avec des tunnels.

Mis à part les prélèvements sanguins à la queue et l'injection du traceur en intraveineuse, les protocoles expérimentaux utilisés dans ce projet ne sont pas susceptibles d'induire de douleur spécifique. Néanmoins, la manipulation quotidienne des animaux pour les mesures du poids et de la prise alimentaire permettra de suivre de manière rapprochée l'état de santé des animaux et de détecter des modifications de leur état physique ou de leur comportement. Les prélèvements sanguins se feront au niveau d'une veine latérale de la queue par un expérimentateur entraîné à la procédure. Les volumes prélevés seront modérés (1,5 ml au total) et ne dépasseront pas 15% du volume de sang des rats. Les animaux seront maintenus par un second expérimentateur dans un tissu et les jours précédents, les animaux seront habitués à cette contention afin de réduire le stress généré. L'injection du traceur en intraveineuse à la queue se fera sous anesthésie gazeuse et sera réalisée par un expérimentateur entraîné à la procédure. Les volumes injectés seront faibles (0,8 à 1,5 ml selon le poids du rat). Tout au long du protocole expérimental, si une perte de poids de plus de 15% sans cause apparente et sans récupération ou des diarrhées sans cause apparente sont détectées grâce au suivi rapproché de chaque animal, il sera sorti de l'étude et euthanasié si son état de santé ne s'améliore pas rapidement.

12981 Les médicaments antiépileptiques utilisés pendant la grossesse provoqueraient un risque accru d'apparition de troubles du spectre autistique chez les enfants à naître. L'attitude actuelle tend vers l'abandon de l'utilisation de l'acide valproïque (VPA) chez les femmes enceintes, en proposant d'autres médicaments, comme la lamotrigine (LTG). Cette étude préclinique consistera à comparer l'effet de deux traitements antiépileptiques administrés lors de la grossesse : l'acide valproïque et la lamotrigine, sur le développement cérébral chez un modèle de souris. Des anomalies de la corticogénèse vont avoir des incidences sur la survenue de pathologies développementales. Pour l'évaluer, nous utiliserons un modèle d'électroporation *in utero* combinée à une analyse immunohistochimique chez des souris sauvages exposées au VPA, à la LTG et à la solution véhicule seule. Cette technique nous permettra, grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes de pouvoir suivre les neurones en migration. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action et les altérations éventuelles de la corticogénèse ainsi que leurs incidences à l'âge adulte, les animaux seront récupérés à différents stades pré- et post-nataux et des analyses *in vivo* ou en *ex vivo* par imagerie microscopique seront réalisées.

Les anomalies anatomiques et les répercussions comportementales seront également évaluées, à différents stades post-nataux, respectivement par imagerie par résonance magnétique (IRM) et par des tests comportementaux.

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

Réduire, remplacer : La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine du développement cérébral. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal permettant de suivre la migration des neurones au cours du développement cérébral. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Avant de procéder à une telle étude, nous nous assurons d'utiliser le nombre minimal d'animaux adéquat pour atteindre le résultat souhaité. Dans ce projet, 1200 souris seront nécessaires pour mieux comprendre l'influence des médicaments antiépileptiques sur le développement cérébral. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Raffiner : Les animaux seront anesthésiés durant la chirurgie. La douleur suite à la chirurgie est considérée comme légère et est prévenue par l'administration de médicaments antalgiques (buprenorphine en début de chirurgie, buprenorphine et metacam en post-chirurgie). En vue de minimiser la douleur et la détresse, et d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans ces études, des soins particuliers seront appliqués aux conditions d'élevage par rapport à des conditions standards (animaux hébergés seuls par cage, placement de la nourriture sous forme de bouillie à une hauteur réduite).

12982 Malgré de nombreuses améliorations dans beaucoup des approches anticancéreuses (amélioration des techniques chirurgicales, des procédures de radiothérapie, introduction et extension des traitements par immunothérapie, seule ou en combinaison), il existe encore de nombreuses situations dans lesquelles la maladie cancéreuse ne peut pas être contenue. Des techniques plus efficaces sont encore nécessaires. L'une de ces techniques a été développée par notre laboratoire : il s'agit de l'électrochimiothérapie antitumorale, qui est particulièrement efficace sur les nodules tumoraux traités, et, surtout, qui présente très peu d'effets secondaires. Il s'agit de la potentialisation par des impulsions électriques locales, de l'effet de certains agents de chimiothérapie (dont la bléomycine, exemple même des molécules incapables de rentrer dans le cytosol des cellules). Les impulsions électriques, très courtes (8 impulsions de 100 microsecondes), délivrées au niveau des nodules tumoraux à traiter, perméabilisent les cellules (sans les tuer) ce qui permet à l'agent cytotoxique de rentrer dans les cellules. Bien qu'administré par voie intraveineuse, le médicament n'est effectif que là où les impulsions électriques sont délivrées. D'autres effets des impulsions

électriques sur les tissus sont très bénéfiques dans le cadre de l'électrochimiothérapie : la libération de substances par la perméabilisation des cellules active le système immunitaire et la perméabilisation des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins a des effets antihémorragiques et anticancéreux prouvés.

Ce traitement n'est pas encore remboursé en France, mais il l'est en Italie, en Allemagne, au Royaume Uni, et dans 5 autres pays européens, et 3000 patients sont traités par an en Europe dans plus de 150 centres de traitement du cancer. Dans notre laboratoire, où ce traitement a été conçu, développé et porté jusqu'en clinique, nous continuons à innover en évaluant des approches qui rendraient ce traitement encore plus efficace et/ou facile à administrer. En effet, malgré les très bons points énumérés ci-dessus, l'application des impulsions électriques engendre des contractions des muscles sous-jacents (et même distants si les nerfs excitateurs passent dans le volume exposé au champ électrique) et des sensations qui peuvent être décrites comme douloureuses (douleur ressentie juste au moment du passage du courant, et pas ou très peu ensuite sauf si la présence du nodule tumorale était déjà très douloureuse). Nous avons donc plusieurs axes de recherche visant à réduire les contractions et/ou la douleur tout en préservant l'efficacité. Les améliorations que nous explorons sont la diminution de l'intensité du champ électrique appliqué (permise, par exemple, par l'addition de nanoparticules conductrices) ou l'utilisation d'autres types de signaux électriques (comme des signaux sinusoïdaux).

Pour tester l'efficacité potentielle de ces méthodes pour l'Homme, nous n'avons pas d'autre choix que de tester *in vivo*, chez des souris porteuses de tumeurs expérimentales greffées, que les améliorations envisagées et détectées *in vitro* (augmentation de l'efficacité de la combinaison bléomycine+impulsions électriques et/ou la diminution de l'intensité électrique pour une efficacité équivalente) sont bien transposables *in vivo* et proposons pour le traitement de patients cancéreux dans le cadre d'essais cliniques. Le recours à l'animal est donc une étape indispensable pour de futures améliorations du traitement des patients. Le nombre de paramètres et de variables qui seront évalués dans cette étape indispensable chez la souris est déjà restreint suite au travail effectué *in vitro* sur les cellules en culture. Les paramètres suivis dans l'étude avec les souris sont ceux déjà utilisés dans nos études antérieures (ce qui implique un bon recul pour juger de l'amélioration potentielle des nouvelles méthodes).

Trois procédures expérimentales seront appliquées. La première combine l'électrochimiothérapie classique (8 impulsions de 100 microsecondes à 1000 ou 1300 V/cm – suivant les électrodes utilisées) à l'injection intratumorale de différents types de particules conductrices (ou les témoins, c'est-à-dire des particules non conductrices), à deux concentrations différentes, sur deux types de tumeurs. La deuxième consiste dans le remplacement des impulsions électriques rectangulaires par des champs alternatifs sinusoïdaux. La troisième consiste dans le prétraitement de la tumeur par des plasmas froids avant de traiter la tumeur par électrochimiothérapie comme décrit sans la procédure n°1. Dans la mesure du possible nous n'effectuerons pas les conditions qui ne se justifieraient pas suite aux résultats obtenus dans les premières expériences, ce qui permettra de réduire d'autant le nombre de souris indispensables à la réalisation du programme expérimental. Le nombre maximal d'animaux nécessaire sera 3720 souris.

Toutes les procédures seront faites sous anesthésie, avec une surveillance étroite des animaux qui bénéficieront d'enrichissement environnemental en tout temps et seront en groupes sociaux.

12983 L'obésité est un problème majeur de santé publique en France et dans le monde. Cette pathologie est fréquemment associée à un risque accru de développer prématurément des maladies cardiovasculaires qui représentent aujourd'hui une des causes de mortalité principales en France. Les dyslipidémies contribuent à la progression de l'athérosclérose, un élément important de ces maladies. Parmi les déséquilibres observés figurent un excès de LDL-cholestérol ou un défaut de la voie antiathérogène du HDL-cholestérol, qui peuvent se résumer à un défaut d'élimination du cholestérol. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitements pharmacologiques efficaces pour réduire l'obésité (et ses complications métaboliques associées) et les chirurgies bariatriques constituent la solution thérapeutique recommandée à l'heure actuelle. En dépit de l'efficacité de ces méthodes

pour réduire l'obésité, peu de travaux permettent d'apporter une explication physiologique et moléculaire à l'amélioration observée sur la sévérité du diabète et des dyslipidémies.

Le but de notre programme de recherche est de mieux comprendre l'effet bénéfique des chirurgies bariatriques sur les dyslipidémies et d'identifier les régulateurs et les mécanismes moléculaires impliqués.

On estime à 735 le nombre de souris utilisées en 5 ans. Afin de suivre la règle de 3R :

Réduire : Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « la règle des 3 R ». Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Le nombre d'animaux nécessaires pour chaque expérimentation a été défini statistiquement ou en fonction de notre expérience passée. Nous avons pris soin d'optimiser au mieux nos expérimentations en choisissant les lignées murines les plus adaptées à l'étude. Les procédures ont été réfléchies afin de réduire au maximum le stress et les souffrances des animaux soumis aux expérimentations.

Remplacer : Il n'existe pas à l'heure de méthodes *ex vivo* / *in vitro* de remplacement à l'expérimentation animale mais nous maintenons nos efforts pour développer des méthodes alternatives notamment via la recherche de lignées cellulaires intestinales compétentes pour mesurer l'excrétion transintestinale de cholestérol (TICE).

Raffiner : Les souris tout au long des procédures douloureuses ont un protocole analgésique et une surveillance adaptée afin de limiter la douleur et la souffrance de l'animal. Les souris sont placées en couveuse à 30°C pendant 5 jours post-chirurgie et sont hébergées en groupe dans des cages enrichies par des frisstis ou une petite maison en carton.

12984 L'obésité est en augmentation croissante dans les pays industrialisés et les pays en voie de développement et contribue à l'augmentation des pathologies cardiovasculaires qui se situent au premier rang des causes de mortalité dans le monde. De ce fait, l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de ces pathologies constitue un enjeu majeur de santé publique. Notre projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans ces maladies en élaborant un modèle murin qui développe à la fois de l'obésité et de l'athérosclérose. Seule l'expérimentation *in vivo*, qui mime de façon fidèle la complexité de la réponse immuno-inflammatoire dans un contexte d'obésité et d'athérosclérose nous permettra de mettre en lumière des acteurs clés impliqués dans la pathogenèse de ces maladies.

Pour cela, nous évaluerons différents paramètres métaboliques et immunologiques chez des souris soumises à un régime riche en gras et en cholestérol afin que ces souris développent à la fois de l'athérosclérose et de l'obésité. Afin d'identifier des marqueurs spécifiques de cette condition, nous allons utiliser 4 groupes de souris

Des souris C57Bl/6 possédant une déficience génétique du gène du récepteur LDL développent de l'athérosclérose sous régime riche en cholestérol.

Un autre groupe de souris représente des souris *Ldlr*^{-/-} mises sous régime gras pour développer de l'obésité.

Un autre groupe de souris sont nourries avec un régime riche en gras et en cholestérol pour développer à la fois l'athérosclérose et l'obésité. Un dernier groupe « control » comprend des souris *Ldlr*^{-/-} sous régime normal.

L'ensemble des souris seront soumises aux différents régimes décrits pendant 20 semaines et à des tests de tolérance à l'insuline et au glucose avant d'être mises à mort. Ces tests consistent en l'administration d'insuline par voie intrapéritonéale ou de glucose par voie orale, des prélèvements de sang seront ensuite réalisés sur souris vigile à différents temps pour doser la glycémie.

Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 120 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Les paramètres expérimentaux ont été établis lors de projets antérieurs, et permettent de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris,

par une surveillance quotidienne rigoureuse des animaux. Nous avons défini en accord avec le vétérinaire, les paramètres physiques et comportementaux à surveiller, et les attitudes à adopter en fonction de chaque situation, et ainsi décidé de points limites. Un niveau de douleur trop élevé entraînerait l'exclusion du protocole et la mise à mort anticipée de l'animal. Les conditions d'hébergements (température, hygrométrie, cycle jour/nuit) seront contrôlées, ainsi que le nombre d'animaux par cage, et un enrichissement par ajout de carrés de coton sera prévu.

Les résultats de ce projet nous permettront d'identifier *in vivo* le rôle de nouvelles molécules impliquées dans le développement des maladies cardio-métaboliques.

12985 La prédiction de mort subite suite à un infarctus du myocarde présente un intérêt majeur en cardiologie. Bien qu'il existe des controverses sur ces effets, les acides gras poly-insaturés de type oméga-3 (AGPI n-3) ont montré des propriétés anti-arythmiques lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse ou lorsqu'ils sont pris via la nourriture. Parmi les causes des controverses des effets bénéfiques des AGPI n-3, 2 sont particulièrement intéressantes. Tout d'abord, ces AGPI n-3, apportés par l'alimentation (huile de poissons gras ou compléments alimentaires) possèdent des propriétés d'incorporations dans les membranes des cellules très variables d'un individu à l'autre. Le second point de controverse est lié au mécanisme d'action potentiel des AGPI n-3 sur les maladies cardiovasculaires. Ainsi nous avons récemment émis l'hypothèse que ces effets pouvaient passer par des métabolites non enzymatiques de certains AGPI n-3, ces derniers étant particulièrement sensibles à l'oxydation *in vitro* et *in vivo*. Or les événements arythmiques sensibles aux AGPI n-3 sont soit précédés soit consécutifs à un stress oxydant important.

L'objectif majeur de ce projet est de déterminer l'importance de la variabilité interindividuelle dans l'incorporation des AGPI n-3 et ses conséquences sur la mort subite post-ischémique (infarctus du myocarde). Pour cela, des souris adultes seront nourries de façon habituelle (environnement enrichi, nourriture et boisson ad libitum, rythme jour/nuit et température contrôlée afin de permettre un mode de vie en accord avec leur comportement) et recevront ou non (groupe témoin) une supplémentation d'AGPI n-3 pour le groupe oméga-3. Nous utiliserons un modèle animal classique d'ischémie-reperfusion du myocarde qui mime l'infarctus du myocarde. Une ligature chirurgicale de l'artère coronaire gauche sera effectuée pendant 30 min chez des souris adultes. Cette ligature provoque une ischémie myocardique suivie d'une réoxygénation, comme lors de l'attaque cardiaque chez l'homme. Ce modèle, parfaitement maîtrisé et en place depuis plusieurs années dans le laboratoire, présente l'avantage d'être facilement réalisable et de permettre ensuite d'évaluer la fonction cardiaque notamment par échographie. De plus, dans ce modèle, les caractéristiques cliniques sont bien documentées et proches de celles observées chez l'homme. Les animaux seront équipés d'un appareil télémétrique permettant d'enregistrer les électrocardiogrammes pendant 4 semaines après la chirurgie.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris adultes (nombre estimé : 140 animaux sur 5 ans).

Nous respecterons le principe des 3 R. Aujourd'hui, aucune alternative basée sur l'utilisation de méthodes *in vitro* ne peut mimer la pathologie (absence de connaissances de base des mécanismes impliqués) ou la physiologie (incorporation d'acide gras apportés par l'alimentation). Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données. Nous réaliserons sur les mêmes animaux des investigations *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*. Pour certaines expérimentations l'animal pourra être son propre contrôle (diminution du nombre d'animaux par groupe expérimental). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux et pour apprécier au mieux les points limites : plusieurs expérimentations réalisées sous la même anesthésie (échocardiographie, chirurgie), limitation du nombre de prélèvements sanguins, courte durée du protocole.

12986 La sclérose en plaque est une maladie invalidante touchant le système nerveux central, caractérisée par une démyélination, une inflammation et une dérégulation immunitaire. Cette pathologie

est médiée par des lymphocytes T présentant une auto réactivité contre les protéines de la myéline et par l'activation de cellules B produisant des anticorps autoréactifs. Cette perte de tolérance au soi accompagnée d'un défaut et d'une dysfonction des cellules T régulatrices, et d'une résistance des cellules T effectrices à la suppression, entraînent un déséquilibre immun responsable de la pathogénèse de la sclérose en plaque.

Les traitements visant à augmenter le nombre de lymphocytes T régulateurs ou à restaurer leur activité suppressive sont des stratégies thérapeutiques potentielles et prometteuses.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps ciblant la molécule CD45RC sur les réponses immunes intervenant dans l'encéphalomyélite immune expérimentale (EAE) induite par la glycoprotéine MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), modèle préclinique de sclérose en plaque chez la souris. Des études antérieures menées par notre équipe ont montré que cet anticorps induisait une mort rapide, temporaire et spécifique des cellules T effectrices CD4+ et CD8+, exprimant fortement ce marqueur, tout en préservant les cellules T régulatrices CD4+ et CD8+ et en augmentant leur nombre. L'administration de l'anticorps anti-CD45RC à des souris atteintes d'EAE, devrait permettre de rééquilibrer les réponses régulatrices et effectrices, et ainsi réduire les atteintes neuro-inflammatoires. Les résultats obtenus permettront d'établir une preuve de concept quant à l'utilisation d'un anticorps ciblant la molécule CD45RC dans le contrôle des réponses immunes, dans une situation pathologique où la fonction des T régulateurs CD4+ et CD8+ joue un rôle majeur.

Cette étude est soutenue par l'INSERM transfert, l'anticorps anti-CD45RC faisant l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies auto-immunes.

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

- Remplacer : A ce jour, aucune expérience *in vitro* ou modélisation informatique ne permet de rendre compte d'une maladie auto-immune telle que la sclérose en plaque. Concernant l'anticorps anti-CD45RC, même si les résultats obtenus dans des analyses fonctionnelles *in vitro* sont prometteurs, ils ne peuvent pas prédire complètement et précisément les effets *in vivo*, du fait de la complexité du système immunitaire et de l'absence du contexte physiologique.

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total maximum d'animaux escomptés pour le test de thérapie par l'anti-CD45RC dans le modèle d'EAE est de 168 souris, le modèle murin d'EAE induite par le MOG étant précédemment mis au point par le laboratoire et donc opérationnel.

-Raffiner : Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de l'EAE et des prélèvements sanguins seront effectués à J10 pour valider la déplétion des cellules par l'anticorps. Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant une paralysie sévère.

Tous les animaux traités avec la molécule et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans la moelle épinière, et par immuno-histologie pour étudier l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

12987 Depuis plusieurs années, le nombre d'infections dues à des bactéries multi-résistantes augmente de manière importante en France et en Europe. En raison du nombre limité de nouveaux antibiotiques, lié à un désengagement des laboratoires pharmaceutiques dans ce domaine de recherche peu rentable, des stratégies alternatives d'utilisation des antibiotiques se développent : la réutilisation de vieux antibiotiques tombés en désuétude est l'une des options, parmi ces molécules on retrouve la colistine qui est souvent un traitement de la dernière chance dans les infections à bactéries Gram-négatif multi-résistantes. Les autres options sont la combinaison d'antibiotiques entre eux en bi ou trithérapie, ou encore la combinaison d'antibiotiques avec des molécules non antibiotiques. Cette troisième option est une approche intéressante qui est de plus

en plus étudiée. Le farnésol et le géraniol, deux molécules non-antibiotiques présentent dans de nombreuses huiles essentielles comme le muguet, le géranium et le citron, ont montré une amélioration significative de l'efficacité *in vitro* d'antibiotiques, comme la colistine, vis à vis des bactéries Gram-négatif multi-résistantes, retrouvées entre autres dans les infections pulmonaires graves. Toutefois avant de pouvoir évaluer l'efficacité ce type de combinaison *in vivo*, il convient de mieux connaître la pharmacocinétique et d'optimiser la voie d'administration de ces molécules, qui ont très peu été administrées à des animaux.

L'objectif de ce travail est donc de réaliser une étude pharmacocinétique comparative de différentes formulations de ces composés chez le rat entre 3 voies d'administration à savoir : la voie intraveineuse, qui est considérée comme la voie de référence, la voie orale et la voie nébulisée. Les formulations étudiées sont : une solution huileuse, administrable par voie orale, une solution de cyclodextrines, administrable par les 3 voies et une formulation plus sophistiquée de nanoparticules, administrable elle-aussi par les 3 voies. Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet est de 224 au total.

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

- « Remplacer ». Les données actuelles à la suite d'administrations systémiques de ces principes actifs *in vivo* sont rares et nécessitent d'être étoffées

- « Réduire ». Une étude statistique a été utilisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux permettant d'obtenir une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats.

- « Raffiner ». Les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (rouleaux de papier, bâtonnets à ronger) avec l'eau et la nourriture qui sont mises à disposition "ad libitum" jusqu'à 12h avant l'expérimentation. Le suivi des animaux permet d'identifier des signes de souffrance, caractérisés par l'état du pelage, le comportement du rat (agressivité/apathie), les cris, la mobilité, l'alimentation... Les techniques chirurgicales et l'administration des traitements sont réalisés sous anesthésie afin de limiter le stress et la douleur de l'animal. De plus, une analgésie préventive pré-opératoire mais également post-opératoire est également réalisée.

12988 L'objectif de ce projet est de comprendre les mécanismes impliqués dans l'organisation et le fonctionnement des synapses inhibitrices au niveau du cerveau. En effet, une altération, même mineur, de la fonction de ces synapses est impliquée dans plusieurs troubles du cerveau, comme la schizophrénie, l'autisme, ou encore l'épilepsie. Le laboratoire étudie une protéine majeure de l'organisation de ces synapses appelée Gephyrine (GPHN). Cette protéine contrôle la localisation des récepteurs inhibiteurs responsables du bon fonctionnement de la synapse inhibitrice. L'expression d'isoformes protéiques de la GPHN a été identifiée comme des facteurs de risque pour de nombreux troubles du cerveau, y compris la schizophrénie, l'autisme et l'épilepsie. Cependant, l'expression des isoformes de la GPHN et la fonction des protéines sous-jacentes sont encore peu connues. Dans ce projet, nous allons utiliser de nouvelles approches pour éclairer les profils d'expression des isoformes de la GPHN, ainsi que la fonction des protéines qui en résultent. Ce projet nous permettra d'avoir une première vue étendue de la diversité de la GPHN et permettra de dévoiler les mécanismes qui contrôlent la formation des synapses inhibitrices. Ces résultats seront essentiels pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces. Dans ce projet, nous utiliserons des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées qui vont mimer les altérations fonctionnelles observées chez l'homme dans divers troubles du cerveau. Ce modèle souris utilisé dans plusieurs laboratoires internationaux est indispensable pour mieux comprendre le développement des synapses inhibitrices chez le mammifère.

Ce projet prévoit l'utilisation de 2198 souris. Nous tâcherons d'appliquer au mieux la règle des 3R : Remplacer: Une recherche approfondie sur Pubmed et Google Scholar (période 2005-2019) a été réalisée et aucune solution alternative n'a pu être mise en évidence pour notre étude. En effet, les méthodes *in vitro* essentiellement basées sur les cultures cellulaires, ne permettent pas de maintenir l'intégrité des réseaux cellulaires et ne présentent donc pas les systèmes de communication multicellulaires nécessaires pour la réalisation de ce projet.

Réduire: nous essaierons au mieux de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle (étude *in vitro* pour identifier les variants d'intérêts, analyse statistique pour limiter la répétition des expériences, optimisation de l'utilisation du tissu dans plusieurs paradigmes expérimentaux).

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

En cas de circonstances imprévues dans lesquelles un des sujets montrerait des signes de détresse, souffrance ou une perte de >15% de son poids corporel (suivi quotidien dans les 72h post-op), l'animal sera euthanasié. Les souris utilisées seront hébergées d'une animalerie. Les portées seront maintenues avec leur mère jusqu'au sevrage. Puis les mâles et les femelles seront séparés et hébergés dans des cages avec couvercle filtrant et contenant du coton avec un environnement enrichi. Les cages seront changées une à deux fois par semaine.

12989 L'obésité morbide est un problème majeur de santé publique et le traitement le plus efficace à long terme est la chirurgie. Le « court-circuit » gastrique ou « By-Pass » Gastrique en Y (BPGY) est l'intervention de référence pratiquée depuis 40 ans dans cette indication. Le Mini By Pass Gastrique en Oméga (MBPGO), est apparu en 2001 comme une alternative aussi efficace mais plus simple que le précédent, avec seulement une suture digestive (au lieu de 2) et moins de complications chirurgicales. Cependant, ce mini-bypass expose l'estomac et l'œsophage au passage de liquide digestif et de bile, appelé « reflux biliaire ». A ce jour, aucune étude scientifique n'a analysé de façon rigoureuse ce risque de reflux biliaire et ses éventuelles complications chez l'homme (Cancer de l'estomac ? Cancer de l'œsophage ?).

Un modèle animal de mini by pass en Omega a déjà été mis au point chez le rat, avec une bonne reproductibilité par rapport aux conditions humaines. Après un suivi de 16 semaines, il avait été démontré une présence importante de bile dans l'estomac et l'oesophage des rats opérés selon cette technique, ainsi qu'un début de modification des parois de l'œsophage et de l'estomac. L'absence de connaissance de l'évolution naturelle de ces modifications et le manque de puissance de l'étude préliminaire amènent à poursuivre ces analyses. Les objectifs de ce nouveau projet sont d'analyser le risque de cancer sur reflux biliaire après mini by pass en Omega sur le long- terme (40 semaines de suivi) et de comparer ces résultats aux rats opérés de Bypass en Y. Le rat, par ses similitudes anatomiques et histologiques avec l'Homme est un excellent modèle expérimental pour la chirurgie de l'obésité. Ce modèle est reconnu et validé dans la littérature scientifique. Son utilisation est nécessaire car seule l'expérimentation *in vivo*, mimant le plus fidèlement possible l'environnement tissulaire après les différentes chirurgies permettra de répondre à la formation ou non de cancer. Le dispositif en Omega doit être testé *in vivo*, et à long terme, pour être une option thérapeutique légitime chez l'Homme.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R. 40 rats non obèses seront utilisés. Ce nombre minimum est suffisant pour permettre une analyse statistique fiable et robuste. Pour éviter toute souffrance, l'intervention aura lieu sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Les rats seront suivis cliniquement pendant 40 semaines (un équivalent humain d'environ 40 ans) quotidiennement en association avec notre équipe vétérinaire. Nous évaluerons le comportement, l'alimentation, l'hydratation, les signes de souffrance. Une grille précise d'évaluation des points limites sera définie et des antalgiques adaptés à ces points limites seront utilisés. Les résultats de ce projet permettront de montrer une incidence plus élevée de lésions de cancer au niveau de l'œsophage ou de l'estomac selon le type de chirurgie. Si on montre une incidence plus élevée de cancer dans le groupe Mini By pass en Omega, il faudra rediscuter l'indication de la procédure chez l'Homme.

12990 Ce protocole d'étude vise à étudier le rôle d'une lectin-like de type C, CLEC-1 dans l'immuno-régulation et particulièrement dans le cross priming et dans la cross tolérance. En effet, la recherche de nouvelles molécules impliquées dans les processus de tolérance en transplantation, a permise l'identification de la molécule CLEC-1 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. L'étude des mécanismes associés à la tolérance représente des enjeux médicaux et

économiques cruciaux. Nous avons préalablement montré chez le rat et l'Homme que CLEC-1 présente des propriétés immuno-régulatrices dans les cellules dendritiques. En effet, CLEC-1 réduit la capacité des cellules dendritiques à stimuler la réponse effectrice des LT CD4+ notamment les Th17 et Th1. Ces résultats suggèrent que CLEC-1 pourrait agir comme récepteur inhibiteur dans les cellules dendritiques en inhibant la réponse T effectrice et la polarisation Th17 et Th1. Ceci est d'un enjeu crucial car les réponses Th17 et Th1 sont impliquées dans le rejet de greffe mais aussi dans les maladies auto-immunes et de nombreuses maladies inflammatoires. Au contraire, bloquer CLEC-1 permettrait d'amplifier une réponse Th1 et Th17 et une meilleure réponse anti-tumorale. La molécule CLEC-1 pourrait donc servir d'outil thérapeutique pour inhiber ou augmenter cette réponse Th17 et Th1. Il s'avère donc important d'étudier de façon plus approfondie la fonction de cette molécule dans des modèles *in vivo* chez le rongeur dans des modèles de cross priming et de cross tolérance. Nous souhaitons étudier spécifiquement le rôle de CLEC-1 dans le compartiment myéloïde et non stromale, c'est pourquoi nous avons besoin de générer des chimères de moelle osseuse à l'aide de souris Clec1a Knock Out. En effet, une meilleure compréhension de la régulation et des actions du CLEC-1 dans des modèles précliniques *in vivo* chez le rongeur est un préalable nécessaire avant d'envisager une transposition chez l'homme. Il est nécessaire d'étudier chez le rongeur ce que fait l'absence de CLEC-1 dans la réponse cross priming et crosstolérance via des chimères de moelle osseuse de KO pour envisager de développer des outils thérapeutiques pour bloquer CLEC-1 chez l'Homme. Il est donc nécessaire d'avoir recours à un modèle animal ressemblant à ce qui se passe chez l'Homme pour tester l'implication d'une molécule. Il est également nécessaire d'avoir accès aux organes lymphoïdes secondaires pour étudier les mécanismes liés à la déficience de cette molécule CLEC-1 ; et non de se limiter au sang comme chez l'Homme.

Notre modèle d'étude sera donc des souris (au nombre de 160 au total) déficientes (KO) en CLEC-1 (40 souris) ou Wild type (40 souris) qui permettront de reconstituer des chimères de moelle osseuse chez des souris WT (80) et ripmOVA (exprimant l'OVA sur des îlots de pancréas) chez lesquels nous projetons d'injecter des LT transgéniques spécifiques de l'OVA (OT-1 (CD8+) et OT-2 (CD4+) pour observer leur prolifération et devenir révélatrices du cross priming et de la cross tolérance.

Nous respecterons strictement la règle des 3R, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés par groupe étudié. Les animaux seront hébergés dans l'animalerie conventionnelles selon les normes qui leur sont propres afin de ne pas ajouter un stress supplémentaire au protocole utilisé et sont maximum 5 par cage. Suite à leur réception, les souris bénéficient d'une période d'acclimatation de 5 jours. Les animaux bénéficient dans leur cage de coton de nidation et de « paper wool ». Les animaux seront suivis tous les jours, afin de détecter le plus précocement une douleur et d'y mettre un terme, soit par traitement antalgique, soit par sacrifice de l'animal notamment si la taille de la tumeur devient trop importante et si la souffrance ne peut pas être contrôlée et ce afin de ne pas biaiser les résultats.

12991 De nombreux candidats médicaments développés sont des anticorps monoclonaux présentant une réactivité limitée à l'espèce humaine. Dans ce cas, leur évaluation pré-clinique doit se faire *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de souris dites "humanisées". L'objectif de ce projet est de proposer l'utilisation d'un nouveau modèle de rongeurs "humanisés": le rat. Ce qui permettra d'effectuer des prélèvements et d'avoir des modèles d'études de la réponse immunitaire humaine qui n'était pas possible à l'heure actuelle. Il s'agit de rat reconstitués avec des cellules hématopoïétiques humaines (originaires de la moëlle ou de sang). *In vivo*, la réponse des cellules immunitaires humaines peut alors être étudiée en absence ou en présence d'une stimulation antigénique ou d'une greffe de tissu humain. Ce modèle pourra représenter une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche pré-clinique.

Nous souhaitons donc mettre en place et par la suite effectuer l'étude de différents anticorps dans ces modèles de rats reconstitués par des cellules hématopoïétiques humaines ce qui nous permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la réponse immune à la transplantation. Ce modèle

permettra l'étude de nouvelles molécules immunomodulatrices, ayant comme finalité la découverte de nouvelles thérapies actives sur le système immunitaire humain.

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

- Remplacer: Des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées au préalable sur les différents anticorps ou molécules immunomodulatrices pouvant être utilisées. Mais du fait de l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de ces molécules dans des modèles *in vivo* proche de l'homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique pourra être le modèle de rats dits "humanisés".

-Réduire: le nombre d'animaux a été réduit à 660 ratons femelles, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner: Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité) sera réalisé. De plus, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé, ceux-ci seront euthanasiés ainsi que les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (igloo en PVC) sera utilisé et placée dans des cages en portoirs ventilées. Durant le protocole, une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée pour leur poids, leur comportement et des prélèvements sanguins seront effectués toute les semaines à compter de la semaine 6 suivant l'injection des cellules hématopoïétiques afin de valider la persistance des cellules humaines chez les rats "humanisés". Les animaux contrôlés et injectés avec des anticorps seront analysés afin d'obtenir un maximum d'information post-mortem: par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Afin de limiter au maximum, le stress dû aux différentes procédures expérimentales nous avons pris des mesures visant à diminuer celles-ci. Il a donc été mise en place:

- imprégnation des gants et de tous matériels de l'odeur de la mère lors de la manipulation des ratons nouveaux-nés, utilisation de lidocaïne sous forme d'un gel NESDERM avant toutes injections, réveil complet des animaux sous une lampe chauffante, surveillance régulière des animaux...

La validation de molécules dans ce modèle préclinique de rats humanisés pourra être une étape essentielle avant les tests cliniques.

12992 Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une diminution progressive de la vision puis une cécité. Aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour. Dans des études antérieures, l'équipe avait identifié que le gène *Nxn1* codait pour 2 formes d'un facteur ayant un rôle protecteur sur les photorécepteurs : le RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et RdCVFL (forme longue du RdCVF). Après plusieurs études ayant menés à des résultats concluants sur les effets bénéfiques du RdCVF(L), l'équipe s'engage dans une voie de tests précliniques sur l'animal afin de vérifier la possibilité d'utiliser le RdCVF(L) comme agent thérapeutique.

Dans ce projet, nous proposons de tester l'efficacité thérapeutique du RdCVF(L) en l'injectant via des outils viraux à un modèle murin de rétinite pigmentaire (la souris rd10). Les effets protecteurs seront évalués à l'aide d'électrorétinogrammes, de tests d'acuité visuelle et d'images de la structure des couches de la rétine. Des études histologiques complémentaires seront réalisées après euthanasie de l'animal.

Au total 1290 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles et les différentes doses testées. Ces expérimentations ne peuvent être réalisées *in vitro* car il s'agit ici de valider une étude préclinique dans la cadre d'un essai thérapeutique pour la rétinite pigmentaire. Les groupes ont été réduits au maximum pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et permettant de valider l'objectif scientifique de ce projet. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou

le personnel qualifié des animaleries et bénéficieront d'une anesthésie pour certaines procédures. Les mesures prises ici respectent le 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

12993 Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules est la principale cause de décès par cancer dans le monde. La majorité des patients sont traités par chimiothérapie ou radiothérapie, éventuellement en association avec l'immunothérapie ou des thérapies ciblées. Cependant, la survie à cinq ans n'est que de 15%, ce qui est principalement dû aux métastases. Il est indispensable de poursuivre les recherches pour mieux connaître les facteurs pouvant impacter la progression tumorale et les phénomènes de résistance aux traitements. Les mutations les plus courantes chez l'homme pour ce type de cancer est l'activation du gène K-ras (10 à 30%) et une perte de fonction du gène p53 (50 à 70%). C'est pourquoi, nous souhaiterions utiliser un modèle animal murin original de cancer pulmonaire muté pour les gènes K-ras et p53. Ces souris développent des tumeurs spontanées de cancer pulmonaire, similaire à la pathologie humaine. De plus, des études épidémiologiques montrent un lien potentiel entre les infections respiratoires, l'inflammation chronique et le cancer du poumon.

Parmi les virus respiratoires retrouvés en pathologie humaine, le virus influenza A et le virus respiratoire syncytial (RSV) sont fréquemment incriminés. Sur la base de ces données, nous pensons que les infections virales respiratoires peuvent avoir un impact sur l'évolution des tumeurs pulmonaires. Nous souhaitons donc travailler sur un modèle de tumeurs pulmonaires spontanées afin d'étudier les effets des infections virales respiratoires.

- sur l'incidence et la progression tumorale pulmonaire,
- sur l'incidence des métastases
- sur la réponse immunitaire anti-tumorale
- sur la réponse aux traitements par thérapies combinatoires (chimio/immuno-thérapies).

Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 1545 animaux. Tous les animaux demandés pour ce projet seront utilisés.

La règle des 3R sera appliquée :

Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation : les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles.

Refine (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : des points limites ont été établis, pour définir à quel moment sacrifier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

Replace (Remplacer) les modèles animaux : pour ces expériences, les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions les effets d'infections virales sur la progression des tumeurs pulmonaires dans un organisme où le système immunitaire joue un rôle important. Ceci ne peut donc pas être étudié *in vitro*.

12994 Au cours des dernières années, il est devenu évident qu'un équilibre approprié entre la transmission synaptique excitatrice et la transmission synaptique inhibitrice est nécessaire pour le bon fonctionnement de notre cerveau. Les interneurons néocorticaux GABAergiques (types de neurones inhibiteurs), sont extrêmement divers dans leurs propriétés anatomiques, physiologiques et moléculaires, chaque interneurone ayant un rôle particulier et unique au cours du traitement de l'information. Cependant, les mécanismes cellulaires impliqués dans le recrutement différentiel des différents sous-types d'interneurones néocorticaux ne sont pas complètement connus. Nous avons constaté que les niveaux d'expression et les propriétés des récepteurs au glutamate de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate) sont très variables entre différents sous-types d'interneurones. Au niveau des cellules pyramidales ce type des récepteurs jouent un rôle important dans les phénomènes d'intégration synaptique aussi bien que dans le remodelage synaptique. Nous proposons, premièrement, que cette diversité des propriétés et des niveaux d'expression des récepteurs au glutamate de type NMDA (NMDAR) apport à chaque sous-type d'interneurones des propriétés d'intégration dendritique différents. Deuxièmement, nous faisons comme hypothèse qu'une telle

variabilité des niveaux d'expression de récepteurs du type NMDA entre les différents sous-types de interneurons entraîne également des variations au niveau des dynamiques de remodelage synaptique entre les différents d'interneurones.

Pour tester les différentes hypothèses proposées, nous prévoyons d'utiliser une combinaison de techniques électrophysiologiques et d'imagerie à la fois *in vivo* et *in vitro*.

Nous prévoyons de révéler de nouveaux mécanismes cellulaires impliqués dans le recrutement des différents sous-types d'interneurones qui constituent actuellement la principale cause de plusieurs maladies neurologiques telles que la schizophrénie, le trouble du spectre autistique et diverses formes d'épilepsie. Ce travail devrait fournir aussi un ensemble de données originales et importantes sur la stabilité et la régulation des connexions excitatrices sur les interneurons néocorticaux.

L'espèce utilisée sera la souris. Pendant la durée du projet (5 ans) un total de 3405 souris seront utilisées. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées. Les conditions de stabulation suivent les règles imposées par le comité éthique. En bref, le nombre d'animaux par cage est déterminé en fonction de leur taille et de leur poids. L'enrichissement consiste, pour les stocks d'un quart de coton et pour le croisement un quart de coton et une maisonnette de carton. Tous les animaux provenant d'un éleveur auront une semaine d'acclimatation avant toute procédure.

12995 La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). On pense actuellement que la dépression se manifeste chez le sujet adulte, mais que des symptômes existent dès l'adolescence. Cependant, il n'existe pas de modèle expérimental permettant de caractériser cet état chez l'animal adolescent. Le but de cette étude est la mise au point d'un modèle animal de dépression adolescente, et la mise en évidence des marqueurs neuronaux associés. Notre approche se basera sur l'apparition spontanée d'un phénotype de type dépressif chez l'adolescent. Après différents tests comportementaux nous avons sélectionné des animaux selon leurs performances mnésiques, leurs comportements anxieux et leurs facultés à prendre du plaisir avec une boisson sucrée.

Ainsi trois groupes de 12 souris aux comportements opposés et ceux aux profils intermédiaires seront testés dans un appareil d'imagerie scintigraphique, soit un total de 36 souris pour étudier leur fonctionnement cérébral. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : Les différentes procédures seront réalisées sous anesthésie. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative ni substitutive n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12 sujets par groupe).

12996 Les systèmes cérébraux de récompense jouent un rôle crucial dans l'adaptation du comportement aux particularités de l'environnement. L'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels l'activation des systèmes de récompense modifie durablement les réponses comportementales est d'une importance médicale et sociétale considérable puisque les addictions et désordres alimentaires sont deux fléaux majeurs des sociétés modernes qui impliquent des perturbations des systèmes de récompense. Ce projet a pour objectif d'identifier modifications

durables de l'ARNm et de l'ADN induites par les apprentissages contrôlés par la récompense (conditionnement opérant pour de la nourriture à forte palatabilité ou ordinaire). La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de différentes lignées de souris transgéniques permettant l'identification de ces modifications durables dans différentes classes de neurones du striatum.

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante.

Réduire: Cette étude transcriptomique et épigénétique s'articulera autour de 2 objectifs qui impliqueront 3 procédures expérimentales (classes légères à modérées). Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 1110 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées. Dans le but d'une exploitation maximale des données obtenues, plusieurs régions cérébrales seront systématiquement analysées.

Raffiner: Toutes les souris seront utilisées de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Les animaux seront hébergés en groupe dans des environnements enrichis (nids végétaux). Afin de diminuer le stress, les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs avant chaque procédure expérimentale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance sont détectés.

Remplacer: Le projet reposant sur l'identification de modifications durables de l'ARNm et de l'ADN sous-tendant la mise en place d'apprentissage contrôlé par la récompense, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

12997 Ce projet a pour but d'évaluer l'effet d'une cytokine produite par les cellules immunes (IL-17) sur la multiplication des cellules cancéreuses en particulier dans le cadre du cancer du pancréas. Nous souhaitons analyser l'impact du blocage de cette cytokine sur la tumorigénèse et son possible effet synergique avec une chimiothérapie. Ceci permettrait de valider l'utilisation des anticorps anti-IL-17 comme candidats pour l'immunothérapie anti-tumorale dans les cancers du pancréas.

5 approches complémentaires (procédures) sont utilisées pour réaliser ce projet. Ces procédures nous permettront de trouver les conditions idéales d'expérimentation, d'évaluer l'inhibition de la voie IL-17 sur la croissance tumorale, d'étudier la réponse immunitaire anti-tumorale et enfin les effets de l'inhibition de la voie IL-17 en combinaison avec la chimiothérapie.

Au maximum, 2400 souris pourront être utilisées pour ces 5 procédures. Durant ce projet nous suivrons le principe des 3R qui consiste à remplacer, réduire et raffiner. Pour cela nous avons au préalable tester l'effet du blocage d'IL-17 *in vitro* sur des cellules pancréatiques ; ce projet découle de résultats préliminaires encourageant sur son efficacité.

Toutes les expériences sont menées par du personnel formé et compétent. De plus le contenu de celles-ci intègre les impératifs éthiques, les modalités d'hébergement, d'enrichissement du milieu, de prévention de toute douleur, détresse, et/ou inconfort chez l'animal. Les effectifs donnés dans ce projet ont été évalués par les biostatisticiens de notre laboratoire et les résultats de ce projet seront analysés par cette équipe afin de déterminer la significativité.

12998 L'objectif du projet est d'évaluer l'impact de la sélection génétique pour améliorer l'efficacité alimentaire de tilapias *Oreochromis niloticus*.

Actuellement, il existe globalement deux méthodes de mesures de l'efficacité alimentaire chez les poissons. La première est d'élever chaque poisson dans un aquarium isolé et de suivre la croissance de chaque poisson en fonction de ce qu'il consomme. La seconde méthode consiste à élever des poissons en petits groupes et par identification visuelle de chaque poisson, de compter le nombre de granulés consommé par chacun et sa croissance. C'est cette seconde méthode qui sera utilisée dans la présente expérience, car bien que chronophage en analyses, elle permet d'élever les poissons en groupes et de nourrir les poissons avec des rations optimales.

Le projet va comporter quatre étapes :

- Etape 1 : Adaptation (7 jours): les poissons, précédemment élevés dans des bassins, seront placés en aquariums. Les groupes seront formés de 10 poissons par aquariums.
- Etape 2 : Mesure de l'efficacité alimentaire (7 jours) : les poissons identifiables visuellement individuellement seront nourris par granulés pour tous les repas. Ces repas seront filmés, et par la suite, un comptage du nombre de granulés consommé par chaque poisson à chaque repas sera réalisé. Cela permettra, avec le suivi de croissance, de calculer l'efficacité alimentaire précise de chaque poisson.
- Etape 3 : Mise à jeun (7 jours) : après la phase de mesure de l'efficacité alimentaire, les poissons seront mis à jeun pendant 7 jours. Il a été précédemment montré des fortes relations génétiques entre la perte de poids au jeun et l'efficacité alimentaire. La perte de poids au jeun est une mesure simple à mesurer, alors que l'efficacité alimentaire est particulièrement complexe, il serait donc très intéressant de mettre en évidence une forte corrélation phénotypique entre ces deux caractères pour une potentielle future utilisation dans les programmes de sélection génétique. Il est à noter qu'à cet âge, les tilapias peuvent subir des périodes de jeun de plus de 10 jours.
- Etape 4 : Croissance compensatrice (28 jours) : Suite à la période de jeun, les poissons seront nourris et leur croissance sera suivie pendant 4 semaines pour évaluer l'importance de la croissance compensatrice, croissance qui est normalement plus forte que la croissance normale des poissons et qui est mise en place physiologiquement par les poissons en réponse à la période de jeun.

Le projet sera réalisé sur 400 poissons, permettant ensuite de sélectionner parmi ces 400 poissons les 30 poissons les plus efficaces et les 30 poissons les moins efficaces, ces derniers seront par la suite utilisés comme géniteurs pour produire une nouvelle génération de poissons. Les effectifs ont été calculés à partir des connaissances que nous avons acquises au cours de précédentes expérimentations (Réduction).

Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles et sont disposés dans des aquariums leur permettant de nager librement (Raffinement). Enfin, pour chaque biométrie et/ou manipulation, les poissons seront anesthésiés afin d'éviter tout stress (Raffinement).

Ce protocole ne comporte pas de Remplacement, la mesure sur les poissons des caractères étant pour l'instant nécessaire.

12999 L'ostéosarcome est une tumeur osseuse qui touche essentiellement les enfants et les adolescents. Malgré les avancées de la médecine personnalisée, il n'y a eu que de faibles progrès dans le traitement des ostéosarcomes. Plusieurs aspects participent à cette situation décevante, dont le faible nombre de modèles d'ostéosarcomes précliniques disponibles. Un modèle préclinique d'ostéosarcome plus prédictif, plus proche de l'homme est nécessaire. Or les modèles d'ostéosarcomes établis à partir de tumeurs de patients (ou PDX) sont difficiles à générer. Un tel modèle a été généré et validé comme conforme à la tumeur du patient par des anatomopathologistes. Cependant, il a pour inconvénient d'être greffé sous la peau. Or pour l'ostéosarcome l'environnement originel de la tumeur influence beaucoup son comportement (croissance, métastases notamment, résistances thérapeutiques). Aussi, à partir de ce modèle PDX, un modèle d'ostéosarcome PDX implanté dans sa localisation originelle (implantation intratibiale) va être généré. Dans ce projet, au maximum 183 souris seront utilisées et réparties dans 5 procédures expérimentales. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum mais dans des mesures satisfaisantes pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative à l'établissement, la validation et à la conservation du modèle. Ce projet s'articulera en plusieurs étapes.

-Une première étape de « réactivation du modèle » à l'aide d'une tumeur congelée permettra à partir de souris « donneurs » d'implanter des greffons tumoraux sur les animaux utilisés dans la procédure suivante.

-La seconde étape déterminera la quantité de cellules à implanter pour l'obtention du modèle. Trois doses de cellules seront testées sur un groupe d'animaux et l'évolution des tumeurs sera suivie au

cours du temps. Les tumeurs seront congelées pour conservation et être utilisées dans la procédure suivante

- Afin de valider le modèle, l'étape suivante consistera à implanter des cellules décongelées à la dose déterminée lors de la procédure précédente. Cette procédure sera réalisée sur le nombre d'animaux minimum permettant de valider l'étape de congélation/décongélation du modèle.

-Puis dans une étape supplémentaire nous étudierons la cinétique de ce modèle sur une faible cohorte d'animaux. Le modèle sera généré par implantation de la dose de cellules déterminées lors de la seconde procédure. L'évolution de la tumeur sera suivie au cours du temps par imagerie.

-Puis, l'activité antitumorale d'un agent sera testée dans ce modèle afin de caractériser sa réponse à un traitement conventionnel de l'ostéosarcome. Cette évaluation sera réalisée sur le nombre d'animaux minimum afin d'obtenir des résultats statistiques qui permettront de prouver avec certitude l'effet de la thérapie.

Tout au court de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal.

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés par cage de 5 individus. Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale et après administration d'un analgésique.

L'administration d'anesthésique, d'analgésique et d'antalgique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Ce projet de recherche permettra de valider un nouveau modèle PDX orthotopique d'ostéosarcome. La mise à disposition d'un tel modèle préclinique permettra d'améliorer les connaissances de l'ostéosarcome en particulier sur les interactions entre cette tumeur et son environnement osseux et de tester de nouvelles approches thérapeutiques dans des conditions se rapprochant le plus possible de l'évolution clinique. Ce projet est donc véritablement dédié à l'amélioration des connaissances d'une tumeur rare.

13000 L'obésité est reconnue comme une maladie chronique par l'OMS depuis 1997, définie comme "une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé «. Les études épidémiologiques indiquent qu'en 2015, environ 2,3 milliards d'adultes étaient en surpoids, dont plus de 700 millions d'obèses. Cette prévalence inquiétante s'accompagne en outre d'une mortalité importante: on attribue directement à l'obésité environ 3,5 million de décès par an au niveau mondial. Face à ce contexte, l'armada thérapeutique s'avère relativement pauvre, et s'accompagne en outre de posologies contraignantes et d'effets secondaires non négligeables. La recherche de nouveaux traitements anti-obésité s'avère ainsi d'intérêt majeur en termes de santé publique.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel pharmaceutique qui développe le composé X, destiné à l'amélioration de l'obésité, du diabète de type II et de leurs symptômes associés. Une première étude pilote, réalisée par le client, a démontré l'efficacité du composé X à réduire le poids corporel chez la souris. La présente étude a pour objet d'explorer les mécanismes d'action du composé X pouvant expliquer son effet sur le poids corporel, notamment en explorant son impact sur la prise alimentaire, les dépenses énergétiques, l'activité locomotrice et la glycémie chez la souris sauvage.

La présente étude nécessitera l'emploi de 40 souris CD-1 réparties en 5 groupes expérimentaux composés de 8 animaux : Groupe contrôle, 3 Groupes traités au composé X à 3 doses, Groupe composé de référence (Liraglutide). La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques précoces cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les dépenses énergétiques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Pour des raisons techniques (mesures de prise alimentaire), les animaux seront hébergés en cages ventilées individuelles mais un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire, l'activité locomotrice et les dépenses énergétiques.

13001 L'hypercalciurie (excès de calcium dans l'urine) est le principal facteur de risque de développer des calculs rénaux. Pour comprendre la physiopathologie de la maladie humaine, nous avons étudié un modèle de rat (le rat GHS) qui a les caractéristiques de la maladie humaine. Au cours de cette étude, nous avons pu localiser un segment dans le rein, la branche large ascendante de l'anse de Henle, où le transport de calcium est anormalement bas chez les animaux GHS par comparaison aux animaux témoins. La raison de ce défaut de transport de calcium est probablement une résistance aux effets de la vitamine D. En effet, le récepteur de la vitamine D est anormalement peu exprimé dans ce segment chez les animaux malades. Nous voulons maintenant savoir si le récepteur de la vitamine D contrôle effectivement l'expression de certaines protéines importantes pour la conservation du calcium par le rein : ces protéines font partie de la famille des Claudines. Elles se situent dans les jonctions intercellulaires et permettent le passage du calcium de l'urine vers le sang. Nous injecterons de la vitamine D active à 10 rats mâles hypercalciuriques et 10 rats mâles témoins pendant trois jours, par voie intrapéritonéale, puis nous prélèverons les reins pour étudier l'effet de la vitamine D active sur l'expression des gènes de ces protéines et leur localisation dans le rein. Cette étude permettra de déterminer si l'expression des gènes de ces protéines est effectivement sous la dépendance de la vitamine D et si la réponse à la vitamine D est différente chez les rats hypercalciuriques et les témoins, ce qui serait une avancée considérable dans la compréhension de la maladie.

La règle des 3R a été appliquée du mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude. Toutes les procédures le nécessitant seront réalisées sous anesthésie. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité des paramètres d'intérêt en fonction des conditions expérimentales. Les animaux bénéficient d'un environnement enrichi et leur souffrance est prise en compte et atténuée au maximum (raffinement).

Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'art de manière à avoir la meilleure performance des mesures réalisées et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (réduction). Vingt animaux (10 témoins et 10 GHS) sont utilisés dans le projet. Il n'y a pas d'alternative à cette étude, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement du tissu rénal intact.

13002 Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4 000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive profonde de la vision ou une cécité. Les études menées antérieurement par l'équipe sur les RP ont mis en évidence que le gène *Nxn1* code par épissage alternatifs pour des facteurs ayant une fonction protectrice sur les photorécepteurs, RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et RdCVFL. RdCVF est sécrété par les photorécepteurs à bâtonnet et médie une activité protectrice sur les photorécepteurs à cône. Le second produit du gène *Nxn1*, RdCVFL, jouerait quant à lui un rôle protecteur sur les photorécepteurs à bâtonnet des effets photo-oxydatifs de la lumière.

Nous nous proposons ici d'étudier les conséquences de l'absence de RdCVFL seul (lignée de souris transgénique RdCVFL^{-/-}) sur la fonctionnalité des photorécepteurs au cours du vieillissement « normal » ou « accéléré » (induction d'un stress oxydatif) en comparaison avec le modèle de souris déficiente à la fois pour RdCVF et RdCVFL (modèle étudié depuis plusieurs années par l'équipe) et des animaux contrôles. Toutes conditions et génotypes confondus, ce projet nécessitera l'utilisation de 560 souris.

Le phénotypage d'un modèle animal se peut s'effectuer par des modèles de cellules *in vitro*. L'utilisation de l'animal est donc indispensable à cette étude.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries.

Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe et d'une anesthésie cornéenne pour les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'art. R.214-105 « règle des 3R ».

13003 Malgré les progrès médicaux, les maladies cardiovasculaires sont, avec les cancers, la principale cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés (environ 150 000 morts par an en France). Les maladies cardiovasculaires ont principalement pour origine l'atteinte ischémique (manque d'oxygène) du myocarde et l'hypertension artérielle. L'évolution au long cours est le développement de l'insuffisance cardiaque ; le cœur n'est plus capable d'assurer la perfusion des tissus et le taux de mortalité atteint 50% à 4 ans. La recherche dans ce domaine reste donc un enjeu majeur de santé publique.

Le stress supporté par le cœur suite à un infarctus induit dans un premier temps la mise en place de mécanismes de compensation, tels que l'hypertrophie cardiaque ou l'activation de systèmes neuro-humoraux, visant à assurer une perfusion adéquate. Cependant, ces mécanismes induisent également des altérations du muscle cardiaque qui culminent jusqu'au développement de l'insuffisance cardiaque. Nos objectifs de recherche sont de valider une nouvelle cible thérapeutique pour contrer les acteurs moléculaires délétères des phases précoces du remodelage et ceux de la transition vers l'insuffisance.

Nous respectons la règle des 3R pour cette étude:

Remplacement: Nous avons précédemment utilisé des méthodes alternatives pour la découverte et la validation de cibles thérapeutiques (screening moléculaire et pharmacologique *in vitro* et *in silico*), ce qui nous a permis de limiter notre champ d'investigation à une cible thérapeutique. Nous avons ensuite utilisé des modèles murins ayant cette modification génétique ciblée permettant de tester l'implication physiopathologique de la protéine d'intérêt. Nous avons réalisé un screening pharmacologique et isolé un inhibiteur sélectif de notre protéine cible. L'étiologie humaine de l'insuffisance cardiaque post infarctus est reproduite chez l'animal par une intervention chirurgicale. Malgré le caractère délétère, cette intervention est nécessaire pour reproduire dans un système intégré, l'animal, les différentes composantes de la pathologie humaine. Ceci est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent. Malheureusement, il n'existe actuellement aucune méthode (*in vitro* ou *in silico*) permettant de suivre l'évolution de l'insuffisance cardiaque.

Lors de cette étude et dans un souci de réduction, chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie. Compte tenu de la variabilité de ces mesures, 10 souris seront utilisées par groupe. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera estimé à 40.

Raffinement: L'intervention chirurgicale, qui vise à reproduire chez l'animal l'infarctus du myocarde tel qu'il est observé en clinique, est réalisée sous anesthésie et analgésie pré, per et post opératoire. Pour améliorer le quotidien des souris, des matériaux de litière ou des structures de repos adaptés sont installés dans les cages (mouchoir en papier, rouleau en carton...).

13004 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Dans des études antérieures, l'équipe a montré que deux gènes *Nxn1* et *Nxn2*

codaient pour des facteurs impliqués dans la survie des photorécepteurs à cônes au niveau de la rétine, le RdCVF « Rod-derived Cone Viability Factor » et le RdCVF2. Contrairement au gène *Nxn1*, l'expression du gène *Nxn2* n'est pas restreinte aux photorécepteurs. Ce dernier s'exprime dans d'autres régions du système nerveux central (SNC) comme les neurones olfactifs. Ces deux gènes codent chacun pour une forme courte et une forme longue de la protéine (RdCVF/RdCVFL et RdCVF2/RdCVFL2). Nous avons aussi montré que c'est l'interaction entre la forme longue du RdCVF2 et la protéine TAU, qui prévenait cette dernière de modifications délétères comme observé dans le cerveau de patients atteints de la MA. De manière intéressante, un variant modifié de la forme longue du RdCVF2 a été identifié dans le cerveau de patients atteints de la MA. Le but de notre étude est d'étudier le rôle protecteur de la forme longue normale et modifiée du RdCVF2 dans le SNC. Ces analyses seront réalisées sur la souris *Nxn2*^{-/-}. Les animaux seront ensuite euthanasiés et les cerveaux récupérés pour analyses biochimiques, histologiques et métabolomiques. Au total 336 animaux seront nécessaires à ce projet.

Les études métabolomiques et histologiques ne peuvent être réalisés que sur le vivant, ce qui explique l'utilisation du modèle murin.

Les souris bénéficieront d'une anesthésie pour certaines procédures et seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries pour s'assurer de leur bien-être. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée et les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement « règle des 3R ».

13005 L'insuffisance rénale chronique (IRC), est une maladie fréquente. En France, la prévalence chez les adultes est évaluée à 10%. Bien que l'on retrouve souvent les facteurs de risque CV classiques (hypertension, diabète, obésité...) chez les patients souffrant d'IRC, les données démontrent que l'IRC, même modérée, est un facteur prédictif de la mortalité cardiovasculaire (CV). Malgré les progrès accomplis, les mécanismes régissant les complications de l'IRC ne sont qu'incomplètement compris.

On sait toutefois que l'inflammation joue un rôle pivot dans le développement de l'insuffisance rénale et de ses complications cardiaque, vasculaire et métaboliques.

L'aldostérone (hormone minéralocorticoïde) est connue pour réguler la balance hydro-sodée dans le rein. Son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde (RM) est un récepteur nucléaire qui régule l'expression de gènes spécifiques.

En plus de l'épithélium rénal et intestinal, le RM est exprimé dans de nombreuses cellules non épithéliales telles que celles du cœur (cardiomyocytes), des vaisseaux (cellules endothéliales et musculaires lisses), de la rétine (épithélium pigmenté, vaisseaux, cônes) et du rein (cellules mésangiales et podocytes). Expérimentalement, l'administration chronique d'aldostérone associée à une surcharge sodée induit une fibrose du cœur (interstitielle et périvasculaire), des vaisseaux, du rein (glomérulosclérose et fibrose interstitielle) ainsi que des anomalies rétinienne (remodelage et oedème).

Il est désormais bien établi qu'une activation inappropriée du RM s'accompagne de dommages structurels tissulaires. Les données recueillies chez l'Homme et l'animal montrent que l'inflammation (infiltration de monocytes et macrophages, augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires) joue un rôle critique dans le remodelage induit par l'aldostérone. L'activation du RM par l'aldostérone favorise l'inflammation de plusieurs façons, notamment en stimulant la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui activent les facteurs de transcription pro-inflammatoires. La modulation des immunités innée et adaptative par le RM dans les organes affectés par l'IRC (rein, cœur, ...) peut également jouer un rôle critique dans l'instauration et/ou le maintien du remodelage rénal, vasculaire et cardiaque.

Les comorbidités cardiovasculaires de l'insuffisance rénale sont dramatiques et impactent la survie des patients. Il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents des interactions entre

rein et cœur ou vaisseaux, mais également d'identifier des thérapeutiques permettant de limiter ces comorbidités.

Nous avons identifié il y a plusieurs années une nouvelle cible de l'aldostérone qui intervient dans l'inflammation induite par les minéralocorticoïdes. De plus, nous avons identifié récemment deux inhibiteurs pharmacologiques et avons validé en collaboration leurs effets bénéfiques dans l'insuffisance cardiaque modulées par les minéralocorticoïdes. Nous avons généré en collaboration un modèle de rat NGAL KO (crispr) qui nous permettra d'analyser l'ensemble des paramètres (et en particulier la pathologie rétinienne).

Notre hypothèse est que l'inflammation induite par le MR, et en particulier via NGAL, joue un rôle central dans les comorbidités de l'IRC. L'objectif du projet est de comprendre l'impact de NGAL sur les comorbidités associées à l'IRC dans le cœur, les vaisseaux, la rétine, le tissu adipeux en utilisant 1) un modèle de rat NGAL KO 2) une approche pharmacologique testant le bénéfice d'un antagoniste du RM et d'un inhibiteur de NGAL.

D'après notre expérience dans des modèles animaux proches de ce modèle d'IR et en se basant sur la littérature ainsi que sur le résultat d'un logiciel de calcul du nombre d'animaux nécessaire en (G-Power), nous aurons besoin d'un groupe de 10 rats transgéniques ou contrôles par condition afin de limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier les différences statistiques entre les résultats. Un total de 1320 rats sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans. Afin de limiter au maximum l'utilisation des rats, les rats dits "contrôles" pourront servir de contrôles pour plusieurs expériences, ainsi, environ 200 rats ne seront probablement pas utilisés si la reproductibilité des résultats nous le permet.

Ces travaux sont complémentaires de travaux déjà réalisés *ex vivo* en culture cellulaire de différents types (rein, cardiomyocyte, cellules inflammatoires) qui supportent notre hypothèse. Toutefois il n'est pas possible de récapituler en cellule les éléments complexes liés à l'IRC ou encore les interactions entre organes qui participent aux effets délétères de l'IRC, effets qui ne peuvent être abordés que chez l'animal.

Nos modèles de rat intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact de l'insuffisance rénale sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier comme le foie par exemple.

Les mesures de raffinement incluent une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie pré et post-opératoire lors de l'induction de l'IRC chez les animaux, les protocoles thérapeutiques que nous allons utiliser sont maîtrisés et utilisés régulièrement dans notre équipe.

Les points limites ainsi que les critères d'interruption d'expérimentation sont pré-définis et un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude

13006 La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après l'étude multicentrique STAR*D, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

On pense actuellement que la dépression se manifeste chez le sujet adulte, mais que des symptômes existent dès l'adolescence. Cependant, il n'existe pas de modèle expérimental permettant de caractériser cet état chez l'animal adolescent. Le but de cette étude est la mise au point d'un modèle animal de dépression adolescente, et la mise en évidence des marqueurs

neuronaux associés. Notre approche se basera sur l'apparition spontanée d'un phénotype de type dépressif chez l'adolescent. Pour cela, nous testerons une grande population de souris aux caractéristiques hétérogènes de sorte à obtenir une importante variabilité.

Ainsi, 550 souris de la lignée SWISS adolescentes (âgées entre 28 et 35 jours) seront testées pour leurs performances mnésiques, leur comportement anxieux et leur état hédonique. Les individus aux performances extrêmes et intermédiaires seront sélectionnés (55 souris anxieux/anhédoniques et avec des performances faibles en mémoire, 55 souris avec le profil opposé, 55 souris avec le profil intermédiaire), et testés pour leurs fonctions exécutives. A l'âge adulte, ces sujets seront exposés à la fluoxétine, un antidépresseur de référence, et la réponse à l'antidépresseur sera évaluée. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude:

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanons plexiglass et cartons, tubes).

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. La sélection des animaux et les effets du stress chronique et ses symptômes chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. L'étude de l'activation cérébrale et de l'implication des réseaux et circuits neuronaux sous-jacents nécessite un animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible pour ce type d'étude.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe).

13007 Ce projet se résume à l'administration d'un composé ou de plusieurs composés non radiomarqués ou radiomarqués par différentes voies d'administration à des singes afin de décrire le comportement et le devenir du produit dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. La réalisation de ce projet fait partie des dossiers présentés aux autorités réglementaires.

L'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination d'un produit dans un organisme vivant ne peut pas être réalisée *in vitro*. Seule l'observation sur un organisme vivant dans son ensemble permet d'évaluer les différentes phases d'absorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination du composé, de définir les relations et/ou interactions entre ces différentes phases et permet aussi de déterminer les niveaux du composé ou des composés administrés, de leurs métabolites et de marqueurs pharmacologiques au cours du temps dans l'organisme.

Le singe est choisi en fonction des résultats des essais préliminaires *in vitro* et *in vivo* (métabolisme) et de sa proximité génétique avec l'homme (cibles thérapeutiques génétiquement similaires). Le singe est pour certains composés l'espèce permettant la meilleure prédiction pour simuler les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques avant de réaliser la première administration chez l'homme. Le singe est couramment utilisé pour ce type de procédure et est accepté par les autorités réglementaires.

Le nombre d'animaux est optimisé en utilisant si possible un seul sexe, le minimum d'animaux pour obtenir des résultats statistiquement fiables et pour répondre aux objectifs du projet. Les doses utilisées sont en général faibles car aucun effet toxique indésirable n'est recherché ce qui permet une réutilisation des animaux. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 180 sur 3 ans.

Par défaut, l'hébergement des animaux est réalisé en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec des enrichissements.

L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, des

analgésiques/anesthésiques peuvent être utilisés pour éviter l'inconfort et minimiser la douleur éventuelle, et un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

13008 Le glioblastome est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive de l'adulte. Sur le plan biologique, cette tumeur se caractérise par une importante vascularisation et une forte expression du VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A). Actuellement, le traitement de première ligne repose sur l'association radiothérapie et chimiothérapie par témozolomide. La récurrence reste inévitable dans un délai médian de 7 à 9 mois et peu d'options thérapeutiques sont alors disponibles. Récemment, le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGFA a permis l'obtention de taux de réponse très intéressants, de 30% à 50%, chez des patients porteurs de glioblastome à la récurrence. Néanmoins, si l'utilisation de bevacizumab est associée à une augmentation significative de la survie sans progression et de la qualité de vie des patients, aucun bénéfice en survie globale n'a pu être identifié en première ligne thérapeutique ou à la récurrence. Ces résultats soulignent la nécessité d'identifier un biomarqueur capable de prédire l'activité de cette molécule. Nous avons récemment identifié deux métalloprotéases (MMP) comme potentiels biomarqueurs prédictifs.

En effet un taux plasmatique initialement élevé de MMP2 ainsi qu'un taux initialement faible de MMP9 étaient significativement corrélés à la réponse, à la survie sans progression et à la survie globale de patients porteurs d'un glioblastome récidivant. A l'heure actuelle, le mécanisme biologique de leur implication dans la réponse aux agents anti-angiogéniques est hypothétique, mais sa compréhension reste indispensable à leur utilisation en pratique clinique. Nous validerons l'intérêt de ces deux marqueurs dans un système intégré (modèle murin-C57Bl/6) afin d'appréhender de façon globale leur rôle dans la vascularisation mais aussi leur rôle de biomarqueur. Nous travaillerons avec une lignée de glioblastome. Quatre traitements seront testés avec un total de 31 souris par traitement, soit un total de 124 souris pour l'étude globale.

Conformément à la législation, le nombre d'animaux utilisés sera validé par modèle mathématiques afin le nombre minimum requis d'individus. Le Raffinement sera mis en place : l'enrichissement des cages sera réalisé avec l'ajout de nids. Le protocole de prise en charge de la douleur pendant toute la durée de l'expérience est proposé, ainsi : les souris seront anesthésiées et des injections d'anesthésique locales en sous-cutanée permettront de compléter l'anesthésie sur le site d'incision et aux points de pression de l'appareil stéréotaxique. Une surveillance anesthésique continue sera effectuée : couleur des muqueuses, fréquence respiratoire, type de respiration, réflexes, réponse à un stimulus douloureux. Une lampe chauffante sera mise en place pour éviter l'hypothermie durant l'anesthésie des animaux. Un tapis chauffant sera utilisé lors de la chirurgie. Dès que l'animal sera inconscient, un onguent ophtalmique sera appliqué sur les yeux afin d'éviter l'assèchement de ceux-ci. Enfin les points limites sont définis par avance et validés par un comité éthique.

13009 La migraine chronique, encore de nos jours, ne bénéficie pas de traitements pour réduire de façon significative les handicaps associés. La migraine se caractérise par des crises à hautes fréquences de céphalées accompagnées de nausées et d'une hypersensibilité à de nombreux stimuli (olfactifs, visuels, auditifs). Un des symptômes des plus handicapants pour le patient est l'hypersensibilité mécanique ou allodynie (stimulus mécanique léger comme le toucher ressenti comme une douleur) qui constitue un marqueur de progression de la migraine vers le stade chronique. Nous savons que les astrocytes (cellules nerveuses qui collaborent avec les neurones) sont significativement impliqués dans la modulation des messages nociceptifs notamment dans l'allodynie mécanique. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la migraine, il apparaît donc nécessaire de savoir si les astrocytes jouent un rôle majeur dans ses mécanismes physiopathologiques. Sachant qu'il n'existe objectivement aucune méthode alternative (R "remplacer") pour ce type d'étude, nous proposons d'étudier l'implication de l'activité des astrocytes dans un modèle animal (rat) de migraine où l'allodynie est déclenchée par administration répétée (1 injection / jour/ 5 jours) d'un vasodilatateur, l'isosorbide dinitrate (ISDN) connu chez l'homme pour

déclencher des crises de migraine. Récemment pour répondre à cette problématique, une étude a été réalisée chez le rat mâle mais sachant que la migraine est une pathologie à dominante du sexe féminin, il convient donc de compléter les résultats obtenus chez le mâle par une analyse chez la femelle. Le but de ce travail est donc de mesurer chez le rat femelle l'allodynie faciale induite par l'ISDN répété et de savoir si les astrocytes jouent comme chez le mâle un rôle significatif dans l'allodynie faciale, témoin de la sensibilisation centrale dans la migraine, et ce via une double approche : comportementale/pharmacologique et électrophysiologique.

Dans l'étude comportementale, la sensibilité mécanique sera mesurée après chaque injection d'ISDN (ou de serum physiologique, témoin), afin de déterminer le seuil de retrait facial (seuil de douleur). Pour cela 2 groupes de rats seront nécessaires (n=10 /groupe) pour montrer si l'ISDN entraîne une allodynie (comparaison entre groupe ISDN et serum physiologique).

Ensuite, si une allodynie faciale significative s'est développée à la suite d'ISDN, nous pourrions tester le rôle des astrocytes. Pour ce faire, un 3eme groupe d'animaux (n=10) sera soumis à une injection de serum physiologique (véhicule, témoin) et ce avant la dernière injection d'ISDN (5eme jour) et sera comparé à un 4eme groupe (n=10) soumis lui à une injection (avant ISDN) d'un bloqueur astrocytaire.

Dans une deuxième partie du projet, 2 groupes d'animaux supplémentaires subiront les injections répétées d'ISDN mais seront anesthésiés le 5eme jour avant la 5eme injection en vue d'enregistrer les activités nociceptives des neurones trigéminaux en réponse aux stimulations périphériques de leur champ récepteurs (électrophysiologie). Ces enregistrements pourront permettre de vérifier si d'une part (comme chez le mâle) l'ISDN répété et lors de la 5eme injection est capable de potentialiser les réponses nociceptives neuronales (n=20) et dans ce cas si le blocage astrocytaire par le bloqueur astrocytaire altère ou empêche cette potentialisation (sensibilisation centrale) (n=20). Le nombre d'animaux par groupe de cette partie est de 20 compte tenu d'une part du pourcentage (75%) d'animaux répondeurs à l'ISDN (allodyniques) et d'autre part il est fonction de la difficulté à isoler les neurones nociceptifs répondeurs et de la durée critique des enregistrements (plus de 2h de maintien de l'enregistrement neuronal chez l'animal).

Au total pour le projet 80 animaux seront nécessaires.

Le nombre de groupe de rats et le nombre de rats par groupe sont réduits au maximum (R "Réduire") tout en préservant une puissance statistique significative.

Dans le respect du "R" de Raffiner, les animaux sont hébergés dans des cages standards bénéficiant d'un enrichissement social et environnemental adapté avec visites quotidiennes. De plus les animaux sont manipulés lors des séances de vérification de l'installation de l'allodynie. Les animaux sont soumis à de très faibles stimulations nociceptives tant en durée qu'en intensité et auxquelles ils peuvent se soustraire facilement. L'expérience du présent modèle de migraine montre que les animaux ne présentent jamais de problème liés aux injections et au développement de l'allodynie mécanique qui pourraient altérer leurs besoins physiologiques et sociaux (la prise de poids, la motricité, les relations sociales restent normales). Dans le cas des enregistrements électrophysiologiques, les animaux seront anesthésiés avec contrôles permanents des paramètres physiologiques (cardiovasculaire et respiratoire) et euthanasiés en fin de manipulation avant réveil.

13010 Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital pour arrêter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 10. 000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important. Certaines pathologies plaquettaires ne peuvent actuellement être traitées que par la transfusion de concentrés plaquettaires. Ces concentrés sont issus de don de sang et représentent une source limitée. Même si aujourd'hui la production de plaquettes *in vitro* est possible, les rendements sont encore trop faibles pour suppléer au don de sang, en raison notamment du fait que la formation des plaquettes *in vitro* est différente de ce qui se passe *in vivo*. *In vivo*, les plaquettes sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules précurseur géantes, les mégacaryocytes (MKs). Afin de libérer les plaquettes dans la circulation sanguine, les MKs doivent traverser la paroi de microvaisseaux sanguins, les sinusoides. Cette paroi est composée de 3 barrières : une

monocouche jointive de cellules endothéliales (CEs), un réseau de protéines extracellulaires (la lame basale) et une couche de péricytes. La manière dont les MKs traversent ces trois couches et les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas compris. Cette étape est essentielle puisqu'elle conditionne directement l'efficacité de production des plaquettes circulantes.

Dans le but d'élucider les mécanismes qui président à la libération des plaquettes *in vivo*, nous souhaitons étudier en temps réel le passage des MKs au travers des trois couches composant la paroi des sinusoides. Pour cela, nous utiliserons une méthode d'imagerie innovante : la microscopie confocale multiphoton. Ceci nous permettra d'accéder à des informations cinétiques inédites et de les corrélérer ensuite précisément et avec une haute résolution à l'ultrastructure des cellules.

Pour suivre le passage des MKs *in vivo* en temps réel, nous utiliserons des souris dont les différents composants cellulaires d'intérêt (MK, CE, péricyte, lame basale) seront marqués par des sondes fluorescentes de différentes couleurs. Sous anesthésie générale et analgésie, nous observerons la moelle du crâne directement à travers l'os (cette zone est translucide chez la souris) afin de visualiser en temps réel le passage du MK au travers la paroi des sinusoides. Après sacrifice de la souris, les tissus seront ensuite fixés et les mêmes zones seront observées avec le microscope électronique afin de déterminer avec précision les interactions cellule-cellule et les zones de passage. Ce projet comporte deux axes : 1) caractériser les voies de passage des MKs, et 2) définir si, et comment, l'intravasation des MKs est modifiée dans des souris présentant un défaut dans la formation de plaquettes

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

Remplacer : Les mécanismes de production *in vivo* sont très différents de ce qu'on observe *in vitro*. L'intravasation des MKs met en œuvre simultanément des interactions entre MKs, les vaisseaux et la circulation sanguine. Ces événements sont intégrés et demandent à être étudiés *in vivo*, d'où la nécessité d'utiliser des modèles animaux.

Réduire : Pour la microscopie confocale multiphoton, le nombre de souris sera réduit par l'utilisation d'un objectif de faible grossissement, ce qui permettra d'observer un champ large et ainsi un grand nombre d'évènement. La deuxième approche d'imagerie électronique permettant de visualiser en détail les zones de contacts MK/sinusoïde sera appliquée à la même souris ce qui permettra également de réduire le nombre d'animaux nécessaires. Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Les expériences ont toujours lieu sur des souris profondément anesthésiées, maintenues au chaud tout au long de l'expérience pour éviter une hypothermie due à l'anesthésie, les yeux protégés par du gel ophtalmique. A la fin de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés avant leur réveil.

Au total, en incluant tous les génotypes, ainsi que les expériences préliminaires pour le choix des anticorps fluorescents, nous prévoyons un maximum de 204 (étude préliminaire : 24 souris, axe 1 : 72 souris et axe 2 : 108 souris)

13011 La chimiothérapie est utilisée dans le traitement de nombreux cancers. Les agents chimio thérapeutiques classiques ont une action bien connue sur les cellules cancéreuses, cependant à cause de leur administration générale dans tout l'organisme, ils sont également actifs sur toutes les autres cellules du corps, notamment celles du système immunitaire. L'effet de ces agents sur le système immunitaire dans un contexte tumoral n'est pas connu. Avec l'essor de nouveaux traitements comme ceux visant à utiliser le système immunitaire contre le cancer, cette question apparait essentielle pour l'utilisation maîtrisée de traitements combinés dans la prise en charge des cancers. En conséquence nous proposons un projet de recherche fondamental et translationnel permettant de mesurer l'effet d'une chimiothérapie sur le système immunitaire chez des souris qui développent spontanément un cancer de la glande mammaire. Le cisplatine est une chimiothérapie

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

L'impact de la chimiothérapie cisplatine sur le système immunitaire n'a pour l'instant jamais été étudié dans ce type de souris et cette étude devrait nous apporter des informations essentielles sur son rôle dans la modulation de la réponse anti-tumorale. Des données préliminaires, acquises *in vivo* chez la souris, ont montré que le cisplatine était capable d'induire une forte augmentation des populations immunitaires au sein de la tumeur 7 jours après traitement et que de manière intéressante, une population immunitaire particulière se trouvait augmentée dès 1 jour après le traitement. Nous voulons maintenant vérifier ces informations dans un modèle de tumeur spontanée et le modèle MMTV-PyMT permet l'étude du développement du cancer du sein spontané.

Pour réaliser cette étude pilote, nous commencerons par déterminer la dose adéquate de cisplatine à utiliser lors d'un suivi de croissance tumorale. Les souris seront traitées à 11 semaines, âge auquel elles présentent des tumeurs mammaires et suivies jusqu'à ce que la tumeur atteigne une taille limite. Ensuite, avec la dose la plus efficace déterminée précédemment, les souris seront traitées par cisplatine et mises à mort 1 ou 7 jours après traitement par chimiothérapie afin d'étudier la qualité des cellules immunitaires dans la tumeur. A l'issue du sacrifice les tumeurs, ganglions drainant la tumeur et les ganglions non drainants seront récupérés puis analysés par cytométrie en flux et par analyse ARN.

L'objectif de cette étude est de comprendre la cinétique des événements immunitaires se passant dans la tumeur après un traitement par cisplatine. Cette étude nous permettra de mieux comprendre les mécanismes déclenchés par le cisplatine afin d'en exploiter les côtés positifs au maximum tout en minimisant les côtés négatifs de ce traitement. Cette étude pourrait nous permettre d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles menant à l'amélioration des traitements existants. Ce modèle de souris développe spontanément des tumeurs mammaires, les traitements que nous allons utiliser permettront de ralentir la croissance tumorale et ainsi de réduire leur inconfort.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront pas répétées plus de deux fois et les rates, les ganglions et les tumeurs seront analysés sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* (remplacement) mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles murins. Enfin, les animaux seront hébergés dans des cages de 10, la souris étant un animal sociable ayant besoin de vivre en groupe, dans des cages bénéficiant d'un environnement enrichi. De plus, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections IP et sacrifice) sera réalisée sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Cette étude nécessitera 170 souris.

13012 L'apport de calcium est essentiel à la bonne santé de la poule pondeuse ainsi qu'à la qualité de la coquille d'œuf. Les besoins en calcium pour constituer la coquille de l'œuf quotidien varient fortement en fonction de l'heure de ponte et de l'âge de la poule et peuvent entraîner un décalage entre les apports en calcium via l'aliment et les besoins de l'animal. Lors de la synthèse de la coquille, l'animal peut alors mobiliser le calcium dans un os spécifique de la patte (l'os médullaire), dont le stock est reconstitué après la ponte. Toutefois, l'animal ne peut pas compenser complètement un déficit en calcium et une sollicitation/reconstitution intense et répétée de l'os médullaire peut entraîner à long terme d'importantes lésions sur le squelette de l'animal. Afin de mieux connaître ces besoins et réduire au maximum la mobilisation osseuse, un modèle mathématique décrivant les flux de calcium dans les différents compartiments de l'animal (système digestif, sang, os...) a été implémenté. Ce modèle permet d'estimer la mobilisation ou la reconstitution de la masse osseuse en fonction de l'apport calcique (forme, quantité) au cours de la

journée. L'objectif de l'essai est de calibrer et valider le modèle en fonction de i) la source de calcium (farine ou particule) et ii) la cinétique journalière d'apport (nombre et durée des repas). Ce modèle aura pour finalité d'être un outil d'aide à la décision à destination des nutritionnistes et permettra d'identifier la/les stratégie(s) nutritionnelle(s) les plus pertinentes en vue d'améliorer le bien-être et la longévité des animaux.

REMPLACEMENT : Compte tenu de l'objectif final du projet (validation d'un modèle *in silico*) et de l'absence de techniques *in vitro* permettant de répondre à cet objectif, le modèle animal ne peut être substitué.

REDUCTION : Un effectif de 288 poules nous permet de constituer 24 groupes de 12 poules. Ce design permet d'évaluer en même temps 6 traitements (3 sources de calcium et 2 modalités d'apport dans la journée) avec 4 répétitions par traitement. 3 séries de prélèvement espacées toutes les 3 semaines seront réalisées. A chaque série, 2 animaux par groupe seront prélevés pour mesurer la cinétique du calcium (calcémie) dans le sang au cours de la journée, après la ponte (8 animaux par traitement et par série). Au regard de la variabilité de réponse, de la bibliographie et d'expériences précédentes, le nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour valider les différentes situations prédites par notre modèle mathématique.

RAFFINEMENT : Les poules seront hébergées dans des parquets au sol sur des copeaux à une densité très inférieure au maximum autorisé. Les animaux auront la possibilité d'explorer, se percher et auront à disposition des nids et plusieurs enrichissements variés au cours de l'étude. Elles seront visitées 2 fois/jours. En cas de picage, les poules identifiées comme piqueuses seront retirées de l'essai et les animaux piqués seront hébergés dans une infirmerie.

13013 Alors qu'elle constitue un fourrage essentiel dans les pays anglo-saxons, la luzerne déshydratée est peu utilisée aujourd'hui en alimentation équine en France. Pourtant, elle présente une composition biochimique intéressante pour la nutrition et la santé des chevaux grâce notamment à sa concentration élevée en protéines. La sous-utilisation est due en partie à la mauvaise image des protéines alimentaires dans la filière équine. Le présent projet vise à mener une étude pour évaluer l'effet de la consommation importante de trois luzernes déshydratées de teneurs protéiques différentes sur la santé digestive chez le cheval.

Les chevaux inclus dans l'étude sont dix-huit hongres Trotteur Français adultes répartis en trois lots homogènes de six individus afin de tester en parallèle trois luzernes déshydratées de teneurs protéiques différentes. Six animaux par lot constitue un minimum pour mesurer l'effet de la luzerne. Les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement. Leur santé est suivie quotidiennement pendant les vingt-huit jours de l'étude (examen clinique, comportement au box, aspect des fèces). De plus le premier et le dernier jour de l'étude une prise de sang est effectuée pour doser des marqueurs sanguins de la santé digestive. Durant l'essai deux prélèvements sanguins par cheval sont donc réalisés à quatre semaines d'écart.

Quotidiennement, les chevaux vont au paddock en groupe et sont exercés par six au marcheur. Ceci permet de respecter leur bien-être. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation.

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

13014 Ce projet de recherche a pour but de développer un modèle de choc septique chez la souris et d'étudier l'effet bénéfique de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sur la résolution de ce choc. En effet les CSM sont des cellules dotées de propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires et auront donc potentiellement un impact positif sur l'immunodépresseion et l'inflammation observées lors d'un choc septique. Cependant, ces caractéristiques sont variables

en fonction de la source tissulaire de ces cellules, notamment si elles sont issues du tissu adipeux ou de la moelle osseuse, cela constitue donc un paramètre important à prendre en compte.

Actuellement, les CSM sont déjà utilisées en clinique pour traiter des pathologies liées à une activation excessive du système immunitaire (maladies auto-immunes, maladie du greffon contre l'hôte ou rejet du greffon...). Leur efficacité clinique repose en grande partie sur leurs propriétés immunomodulatrices. Cependant, il s'avère que les connaissances disponibles sur ces CSM sont essentiellement issues d'études *in vitro*, il est donc nécessaire de réaliser des études *in vivo* pour améliorer nos connaissances sur ces cellules afin de mieux définir la balance bénéfiques/risques des protocoles de thérapie cellulaire les utilisant.

Le respect de la règle des 3R dans ce projet se traduit par :

-le Remplacement: l'étude de l'effet immunomodulateur des CSM en fonction de la source tissulaire a été étudiée *in vitro*, ces travaux nous ont permis d'obtenir un maximum d'informations mais il est indispensable de confirmer ces résultats *in vivo*, en ayant une vraie situation d'inflammation mettant en jeu l'ensemble des partenaires cellulaires qui interviennent lors de l'inflammation. Ceci n'est absolument pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour finaliser cette étude.

-la Réduction: le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet a été évalué en essayant au maximum de le réduire, il sera de 240 souris, il permettra d'appréhender différents paramètres indispensables à la mise en place du modèle et à l'exploitation de ce modèle pour l'étude de l'effet immunomodulateur des CSM provenant du tissu adipeux ou de la moelle osseuse d'un même donneur. Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement fiables.

-le Raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées à savoir des locaux confinés, des portoirs ventilés, de l'eau et de la nourriture ad libitum, ainsi qu'un maximum de 5 animaux/cage. Aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, la chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale et une analgésie préopératoire sera assurée. Les souris seront placées sur une plaque chauffante afin de maintenir leurs températures corporelles pendant l'opération et ce jusqu'à leur réveil. Une surveillance post-opératoire sera mise en place afin d'assurer le bien-être de l'animal opéré, et de l'alimentation supplémentaire sera disposée directement dans la cage afin que les animaux opérés aient un accès facile à celle-ci. Une réhydratation sera effectuée quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation. L'évaluation régulière du score de grimace des animaux ainsi que le suivi de leur poids, de l'évolution de la cicatrisation et de leur comportement permettront d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé. Ainsi si besoin une analgésie adaptée sera immédiatement mise en place, ou l'animal sera sacrifié si il atteint un des critères d'arrêt (perte de poids, augmentation du score de grimace, problème de cicatrisation) que nous avons établi.

13015 La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative incurable qui touche approximativement 30 millions d'individus au niveau mondial et environ 900000 en France. La MA est la forme la plus commune de démence sénile et constitue dans les pays occidentaux la quatrième cause de décès. Ceci positionne la MA comme un problème social et de santé publique. Les approches thérapeutiques actuelles pour la MA restent principalement palliatives et les bénéfices cliniques de ces traitements procurent uniquement une amélioration de la qualité de vie des patients. C'est pour cela qu'il est indispensable de comprendre les mécanismes responsables du déclenchement de la dégénérescence neuronale associée à la MA, afin d'élaborer des traitements curatifs. Pour étudier les aspects moléculaires et cellulaires de la MA de manière intégrée, le recours à des modèles animaux est indispensable.

A ce jour, plusieurs modèles transgéniques murins présentent de fortes similitudes avec la pathologie humaine. Ces modèles ont l'avantage de reproduire au mieux la MA puisqu'elles développent les marqueurs moléculaires et cellulaires de la maladie ainsi que les défauts d'apprentissage et de mémorisation s'aggravant avec l'âge. Comme chez l'homme, nous avons

observé dans un modèle de souris « Alzheimerisées » des dépôts de protéines agrégées intracellulaires et extracellulaires jouant un rôle toxique dès les premiers stades de la maladie.

Une étude en cours réalisée dans des cellules a permis de démontrer un impact direct de l'accumulation de ces fragments sur le métabolisme cellulaire en ciblant les mitochondries (organelles intracellulaires impliquées dans la production de l'énergie au sein de chaque cellule de notre organisme). Vu l'importance des mitochondries dans l'accomplissement des différentes fonctions neuronales et dans le processus de mémorisation, on postule que le défaut énergétique neuronal associé à la production et l'accumulation de ces fragments toxiques peut ainsi participer au développement de la MA. Ainsi, notre projet vise à démontrer: 1) l'implication directe et spécifique des fragments toxiques dans la dysfonction des mitochondries, dans le métabolisme des cellules neuronales, et dans la réponse neuroinflammatoire (caractéristique de la MA) dans des modèles d'étude *in vivo* ; et 2) de cibler une cascade cellulaire permettant de moduler la dysfonction mitochondriale et permettant la suppression ou une simple réduction de l'accumulation des mitochondries dysfonctionnelles, et des effets toxiques associés aux fragments toxiques dans les mitochondries. A plus long terme, ce projet permettra d'identifier de nouvelles orientations thérapeutiques pour soigner la MA.

Ce projet consiste à tester cette hypothèse en utilisant une stratégie génétique et pharmacologique. Nous testerons la production de fragments toxiques, la fonction des mitochondries, la neuroinflammation et des tests comportementaux permettant de rendre compte des déficits cognitifs.

Nous utiliserons des souris transgéniques et des modèles de souris obtenus par une approche d'injection d'adénovirus permettant l'expression de protéines (fragments de protéines) impliquées dans la MA. Des études réalisées par le laboratoire dans le passé ont démontré que ces modèles de souris ne développent pas de phénotype dommageable. En effet, ces souris sont viables, fertiles, ne présentent aucune anomalie physique et ne développent pas de troubles comportementaux qui affectent leur bien être. La validation de nos outils génétiques sera réalisée au préalable dans des cultures primaires de neurones de rat préparés à partir du cerveau de fœtus de rat âgés de 17 jours. Ce projet d'intérêt scientifique met en œuvre la règle des 3R :

Remplacement: La MA est une maladie complexe qui se caractérise notamment par des altérations comportementales et cognitives évoluant avec le temps. De nombreux travaux ont été préalablement réalisés *in vitro* sur des cellules en culture afin de caractériser les mécanismes moléculaires et biochimiques sur lesquels nous nous proposons d'agir dans ce projet. Cependant, aucun modèle cellulaire n'est aujourd'hui capable de reproduire les paramètres nous permettant de tester notre hypothèse.

Réduction: Le nombre de souris a été réduit au strict nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables. La taille des groupes expérimentaux a été établie d'après des calculs de puissance statistique à l'aide d'un logiciel ad hoc. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, l'ensemble des expériences de comportement, d'analyses biochimiques et d'immunohistochimiques seront réalisés sur les mêmes groupes d'animaux.

Raffinement: Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale accompagnée de soins analgésiques pré- et post-opératoires. Tout au long du projet, les animaux feront l'objet d'une observation quotidienne appuyée sur des critères d'observation permettant d'objectiver les contraintes subies par les animaux et leurs conséquences sur leur bien-être. L'utilisation d'une grille d'évaluation et de fiche de suivi permettra de limiter ces contraintes, soit par l'administration de soins appropriés, soit par la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés préalablement établis. Pour ce projet nous utiliserons au maximum 1024 souris et 54 rats.

13016 Le corps humain bénéficie d'un réseau vasculaire très important assurant le transport du sang et des nutriments à travers tous les organes. Ce système circulatoire fermé est vital pour maintenir la fonction physiologique de chaque organe. Les cellules souches pluripotentes sont des cellules très immatures capables de donner tous les types de cellules du corps humain en grande quantité. Ces caractéristiques rendent leur utilisation intéressante en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire

pour régénérer un organe ou un tissu non fonctionnel. L'avancée dans la recherche sur les cellules souches permet aujourd'hui de reproduire *in vitro* le développement embryonnaire d'un type cellulaire ou d'un tissu et par conséquent de générer le composant essentiel des vaisseaux à savoir la cellule endothéliale.

Notre projet est donc de produire des cellules endothéliales fonctionnelles en grande quantité à partir des cellules souches pluripotentes humaines et capables de générer des vaisseaux. L'objectif principal est d'évaluer cette fonctionnalité par la quantification du nombre de vaisseaux générés. Des résultats préliminaires *in vitro* nous ont permis de démontrer la capacité angiogénique de ces vaisseaux.

Pour ce faire, nous prévoyons de réaliser des greffes de progéniteurs endothéliaux sur des modèles d'ischémie localisée sur souris. Au site de l'ischémie, des chambres de visualisation de la peau et des vaisseaux seront installées, et les sites seront observés microscopiquement très régulièrement. Ceci participera au suivi clinique et à l'évaluation du bien-être des animaux.

Les conditions expérimentales *in vitro* (tests d'angiogenèse *in vitro*, comme la formation de réseau en Matrigel ou la tubulogenèse en 3D), permettent de visualiser uniquement des structures pseudo-vasculaires et des capillaires non fonctionnels. Pour évaluer le processus global d'angiogenèse, il est nécessaire de mettre en évidence des vaisseaux avec une circulation sanguine physiologique. L'utilisation de l'animal est donc incontournable pour vérifier le processus complet d'angiogenèse.

Le nombre d'animaux est réduit grâce au suivi longitudinal qui est permis par l'imagerie *in vivo*: mesures de plusieurs points dans le temps sur le même animal.

La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale sur table chauffante et la douleur post-opératoire sera traitée par administration systématique d'un anti-inflammatoire. Des compléments alimentaires (DietGel recovery) seront mis à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Tous les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés a minima trois fois par semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress ni de douleur. L'imagerie des animaux se fera sous anesthésie générale, 2 fois par semaine afin de caractériser les modifications anatomiques et suivre l'apparition du réseau vasculaire tout en respectant un temps de récupération suffisant entre 2 périodes d'acquisition.

Le nombre total d'animaux est de 105 souris réparties sur les 3 ans du projet.

13017 Introduction : Dans un contexte de traumatisme crânien (TC), 27 à 30% des patients rapportent une dysphagie. De plus, elle peut se compliquer d'une malnutrition, d'une déshydratation et de fausses routes. Nous supposons que des troubles de la coordination de la ventilation et de la déglutition peuvent aussi expliquer les fausses routes. En effet, il existe des interactions entre les neurones de la déglutition et les neurones de la ventilation qui sont situés à proximité dans le tronc cérébral. Dans certaines maladies neurologiques, il existe une augmentation de la proportion des déglutitions contemporaines de la phase inspiratoire du cycle ventilatoire ce qui favorise les fausses routes. Le but de ce travail est d'étudier l'effet d'un TC induit expérimentalement sur la coordination de la ventilation et de la déglutition.

Méthode : 20 rats Wistar seront répartis en 2 groupes : 10 rats avec TC et 10 rats témoins. Tous les rats seront explorés par pléthysmographie barométrique au repos et pendant l'ingestion d'eau avant et après induction expérimentale du TC ou après chirurgie contrôle. Les paramètres ventilatoires au repos et pendant la déglutition seront comparés entre l'état sain et après induction du TC ou après chirurgie contrôle. De même, une comparaison sera faite entre les 2 groupes. Le protocole n'excèdera pas 10 jours au total.

Mesures par pléthysmographie barométrique : Les animaux des deux groupes seront mis sous restriction hydrique pendant 12h (pour les inciter à boire de l'eau), puis ils seront explorés par pléthysmographie barométrique au repos. Il s'agit d'un système indolore ou les animaux seront placés lors des tests dans une cage de pléthysmographie avec air renouvelé et taux d'oxygène fixé à 21%. L'animal est donc complètement libre dans une enceinte close. Le breuvage sera mis à leur disposition et les déglutitions de liquide seront donc non forcées. Les évaluations sont considérées

comme non douloureuses puisqu'elles sont non invasives. Le test durant 45 min maximum. La taille du pléthysmographe est de 20 cm de hauteur et de 20 cm de diamètre.

Résultats attendus : Nous déterminerons grâce à cette étude expérimentale si un TC chez le rat s'accompagne d'une augmentation de la proportion des déglutitions contemporaines de la phase inspiratoire du cycle ventilatoire. Il sera ainsi possible d'étudier ultérieurement l'effet de traitements neuromodulateurs sur la coordination de la ventilation et de la déglutition après un TC.

Règle des trois R :

-remplacement : Ce projet ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas d'animaux vivants. En effet, l'étude de l'influence du TC nécessite un système entier et ne peut malheureusement pas être remplacé par un modèle *in vitro* (par exemple culture cellulaire).

-raffinement : La procédure d'apprentissage de la technique chirurgicale (modèle expérimental de traumatisme crânien) sera assistée par un superviseur qui maîtrise convenablement la technique (cette formation sera faite en interne au sein même du laboratoire). Les animaux seront habitués aux locaux une semaine avant les chirurgies et un change de litière sera réalisé afin d'habituer les animaux à être manipulés. L'ensemble des procédures chirurgicales se déroulera sous anesthésie générale avec injection de dérivés morphiniques. L'évaluation sera réalisée auprès d'un système indolore. Par la suite, les animaux seront mis à mort et une étude anatomo-pathologie aura lieu. Les conditions d'hébergement seront conformes aux conditions recommandées et les rats seront hébergés en groupe de 5 avec un enrichissement du milieu (coton de cellulose). Les conditions de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Ainsi, un suivi des animaux sera réalisé durant toute la durée du protocole expérimental, ce qui permettra de déceler un éventuel signe de souffrance.

Le suivi du poids des animaux sera un des points limites (une perte de 15% ou plus de l'animal sera considérée comme un point limite). De même l'examen de l'aspect physique externe (état de la peau, de la fourrure, des yeux et des muqueuses) ainsi que l'apparition de sécrétions, d'excrétions anormales, de changement de comportement et des signes de dyspnée seront minutieusement surveillés quotidiennement. Dans le cas de l'atteinte d'un de ces points limites, une mise à mort anticipée sera réalisée.

-réduire : Le nombre d'animaux a été évalué à partir des études précédentes effectuées dans notre Laboratoire. Le nombre de 10 animaux par groupe nous permettra d'en retirer des résultats statistiquement significatifs. De plus, afin de réduire au maximum le nombre de rats utilisés, les essais de chirurgie seront pratiqués sur des rats décédés issu d'un autre protocole expérimental.

13018 Dans nos sociétés vieillissantes, les problèmes de mémoire liés à des conditions pathologiques ou à l'âge prennent une place grandissante. Il devient donc crucial de comprendre les mécanismes neurobiologiques de la mémoire pour améliorer les diagnostics médicaux et développer de futurs traitements. Notre travail vise précisément à comprendre le fonctionnement du cerveau à l'échelle des réseaux neuronaux, lorsque celui-ci forme et manipule des souvenirs. Les résultats issus de nos travaux auront donc des implications importantes dans le domaine de la santé, pour l'amélioration des conditions de vie humaine.

La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés et l'étude de fonctions cognitives complexes. L'organisation cérébrale chez cette espèce est relativement proche de celle de l'Homme, ce qui permet d'exploiter les résultats obtenus pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la fonction mnésique dans l'espèce humaine. Nous mettrons en œuvre des tâches comportementales qui reflètent les comportements naturels des animaux utilisés. L'odorat est une modalité sensorielle majeure chez les souris, nécessaire à l'établissement de comportements cruciaux pour la survie de l'individu (alimentation, reproduction, interactions sociales...). La signification associée aux odeurs rencontrées, qui permet la production de comportements adaptés, est le plus souvent apprise par expérience.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes neuronaux mis en place quand l'animal forme et manipule un souvenir en lien avec l'olfaction. Plus précisément lorsque la souris apprend :

- 1) une association entre une odeur et une récompense
- 2) une association entre une odeur et une trajectoire dans un labyrinthe,
- 3) à reconnaître un individu (cette mémoire dite « sociale », se base principalement sur l'olfaction).

Au cours de ces tâches, nous enregistrerons, en simultané, l'activité de dizaines de neurones grâce à des électrodes très fines placées au préalable dans les régions cérébrales impliquées ainsi que la respiration. La richesse des informations collectées et le grand nombre de neurones enregistrés via cette méthode sont tels, qu'il nous sera possible de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés. En complément, nous testerons l'impact de sous-populations de neurones sur l'activité du réseau et le comportement de l'animal, en contrôlant leur activité avec une grande précision spatio-temporelle. Les lignées de souris nécessaires à l'utilisation de cette technique ne présentent pas de phénotypes dommageables.

Les procédures de ce projet sont les suivantes :

- Tâches d'apprentissage olfactif nécessitant une restriction en eau de boisson : l'eau est offerte comme récompense et devient source de motivation.

- Mise à mort : pour prélèvement des cerveaux et étude des tissus cérébraux

- Remplacement : La souris est une espèce de choix pour étudier le système nerveux central des Vertébrés qui permet d'obtenir des informations en grande partie transposables chez l'Homme. Ce projet vise à comprendre les mécanismes à la base d'une fonction cognitive complexe : la formation des traces mnésiques olfactives à l'échelle du cerveau entier. Le cerveau doit donc être intact pour que les connexions entre les différentes régions cérébrales soient préservées et que nous puissions étudier leurs activations coordonnées. De plus, nous étudions les circuits neuronaux chez le sujet en train d'apprendre : il nous faut donc travailler avec des animaux vigiles. Il nous est donc impossible de conduire cette étude *in vitro* sur des cultures de neurones dissociés. Enfin, dans l'état des connaissances actuelles, les questions que nous adressons ne peuvent malheureusement pas être réalisées *in silico*.

- Réduction : Le nombre total d'animaux requis pour ce projet est de 300 souris sur 5 ans. Ce nombre sera réduit au minimum grâce aux techniques d'enregistrement utilisées qui permettent de suivre l'activité de dizaines de neurones en même temps. Ce nombre sera réduit davantage grâce à nos études pilotes qui permettront une optimisation des paramètres de nos expériences. Enfin, comme nous pourrons enregistrer l'activité des neurones sur plusieurs jours, un animal pourra être son propre contrôle : nous alternerons les conditions « test » et « contrôle » d'une session à l'autre avec les mêmes souris, plutôt que d'utiliser deux groupes de souris pour chacune des conditions. Cette approche permettra de réduire considérablement le nombre de souris.

- Raffinement : Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels : petits groupes sociaux (maximum 5 souris par cage) au moins jusqu'au début de l'expérimentation, cages enrichies d'éléments permettant de construire un nid (carré de coton, petites maisons en carton, frises de papier kraft) ou de favoriser l'exploration (jouets). L'enrichissement des cages soulagera le stress lié à l'isolement parfois nécessaire des souris lors de nos expériences. Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement selon des critères objectifs. Chaque souris sera habituée à l'expérimentateur et à l'enceinte de test, pendant au moins 3 jours avant le début des tests, pour limiter le stress des manipulations. Une fiche de suivi individuel sera créée pour chaque procédure expérimentale. A partir des critères définis dans ces fiches, des points limites précoces seront établis pour éviter de prolonger toute souffrance.

La mise à mort des animaux en fin d'expérimentation sera nécessaire pour prélever leur cerveau et faire l'analyse post-mortem des tissus cérébraux. Cette procédure sera réalisée par des expérimentateurs compétents et soucieux du bien-être animal, sous anesthésie profonde avec le degré d'analgésie recommandé par les services vétérinaires. La mise à mort sera ainsi indolore pour les animaux, avec une perte de conscience rapide.

13019 L'Australie est un pays indemne de rage c'est-à-dire un pays n'ayant pas déclaré d'infection rabique d'origine autochtone et causée par un membre du genre *Lyssavirus* : le RABV (ou rage classique). Le projet vise à étudier le pouvoir pathogène d'un autre lyssavirus (le virus ABLV - Australian Bat Lyssavirus) isolé en Australie en 1996 sur une roussette (chauve-souris frugivore). Ce virus, très proche du virus RABV a été à l'origine de trois cas humains et deux cas sur des chevaux. A ce jour, très peu d'études ont été réalisées sur le pouvoir pathogène de ce virus et sur sa capacité à franchir la barrière d'espèce, notamment sur des espèces non-volantes.

Les autorités ont récemment rapporté une forte augmentation des cas de personnes ayant été mordues ou griffées par des chauves-souris du genre *Pteropus*. Par ailleurs, il semble que les populations de ces chauves-souris sont en hausse, comme le sont également les populations de renards roux en Australie. Le renard roux est maintenant présent sur la majeure partie de l'Australie ; son aire de répartition est commune avec celles des chauves-souris du genre *Pteropus*. Il est considéré comme une espèce invasive. Son régime alimentaire opportuniste (de prédateur/charognard) très varié fait qu'il mange ce qu'il trouve de disponible. La probabilité de prédation des chauves-souris n'est donc pas nulle. Le projet se déroulera en deux étapes et utilisera au maximum 24 animaux. La première procédure consistera à tester le pouvoir létal sur un faible nombre d'animaux (2 groupes de 2 renards), la seconde sera initiée uniquement si au moins un animal déclare la rage. Un total de 20 renards répartis en 4 groupes de 5 animaux seront alors inoculés avec différentes doses du virus, afin d'étudier la pathogénicité du virus, de suivre l'évolution clinique de l'infection, la cinétique de l'excrétion salivaire et l'éventuelle séroconversion. Les animaux seront hébergés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être, l'enrichissement mis à leur disposition est régulièrement changé. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et entraîné afin de limiter au maximum le stress. Lors de l'autopsie, le virus sera recherché dans différents prélèvements du système nerveux et des glandes salivaires. Ce type d'expérimentation ne peut pas actuellement être conduit *in vitro*.

13020 L'obésité et le surpoids constituent le 5ème facteur de risque de décès à l'échelle mondiale, avec des conséquences médicales représentant jusqu'à 10% des dépenses de santé. Connaître les mécanismes aboutissant à ces complications est donc un enjeu sociétal, économique et scientifique majeur. L'apparition du surpoids est engendrée par une dérégulation de l'équilibre entre dépenses énergétiques et ingéré alimentaire. La régulation de la prise alimentaire est un phénomène complexe faisant intervenir des signaux en provenance de nombreux organes. De récents travaux ont montré que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans la régulation de la prise alimentaire. L'objectif de notre projet est de déterminer la relation entre le microbiote intestinal et le comportement alimentaire chez la souris lorsqu'elle est soumise à un régime hyperlipidique. Trois cent quatre vingt souris seront utilisées. Une première étape consistera à tester l'effet de différentes combinaisons d'antibiotiques administrées aux souris dans l'eau de boisson sur leur ingéré alimentaire lors du passage à un régime hyperlipidique. Deux combinaisons d'antibiotiques seront ensuite retenues pour une deuxième étape. Les souris seront sacrifiées soit avant la mise en place d'un régime riche en lipides, soit après (à J2 et J5) afin de prélever le cerveau, les tissus intestinaux et le sang. Les prélèvements serviront à des analyses métabolomiques, hormonales, histologiques et moléculaires. Les fèces des souris seront également prélevées quotidiennement pour une analyse métagénomique du microbiote intestinal. Ce projet respecte la règle des 3R. Remplacement: cette étude de relation entre microbiote, intestin, cerveau et comportement ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Elle nécessite donc l'utilisation d'animaux. Réduction: l'utilisation du modèle souris permet d'étudier les relations intestin-cerveau et les évolutions du microbiote intestinal *in vivo* en lien avec les nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Le nombre d'animaux prévu permet d'effectuer des tests statistiques sans nécessité de répétition ultérieure de l'expérience. Raffinement: l'anxiété liée à l'isolement en cages individuelles des souris sera minimisée par un enrichissement du milieu. Les procédures prévues sont non invasives, les prélèvements de tissus et de sang ayant lieu après la mort et le prélèvement de fèces étant réalisés lors de l'émission naturelle de fèces par la souris. Le suivi quotidien du poids des souris et de leur comportement constitue les points limites de l'expérimentation (prise ou perte de poids excessive par rapport au poids de départ, apathie de l'animal pouvant être due à l'isolement).

La souche de souris utilisée est par ailleurs moins sensible à la prise de poids lors d'un régime hyperlipidique. La durée de ce régime (7 jours maximum) permet de limiter voire d'éviter les effets délétères à long terme d'un régime riche en graisses.

13021 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/3500 naissances mâles). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine (chromosome X) et se traduit par une dégénérescence du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le cœur et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour. En attendant la mise en place de thérapies curatives, la thérapie pharmacologique est une des approches envisageables pour pallier aux processus physiopathologiques liés à l'absence de dystrophine.

Avant le passage chez l'homme, l'efficacité thérapeutique des approches expérimentales dans le cadre de la DMD est aujourd'hui validée à l'aide de 2 modèles animaux : la souris mdx et le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), tous deux porteurs d'une mutation dans leur gène de la dystrophine. Ces 2 modèles présentent cependant un certain nombre d'inconvénients :

- La souris mdx ne reproduit que partiellement les lésions tissulaires retrouvées chez les patients et est relativement peu malade.

- Le chien GRMD présente des lésions tissulaires proches et une évolution comparable à la maladie retrouvée chez les patients DMD, mais reste un modèle coûteux et lourd à manipuler. Enfin, l'établissement de cohortes statistiquement significatives est quasi impossible.

En 2014, un consortium de laboratoires a généré un nouveau modèle animal de la DMD : le rat DMDmdx. Cette lignée se révèle être un très bon reflet de la pathologie humaine (atteintes supérieures à celles observées chez la souris mdx, comparables voire meilleures et plus reproductibles que celles observées chez le chien GRMD notamment au niveau cardiaque). Ce modèle rat DMDmdx peut donc se substituer au modèle canin pour réaliser les 1ères phases d'évaluation de l'efficacité de nouveaux produits thérapeutiques.

Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de produits pharmacologiques pour le maintien ou l'amélioration des fonctions cardiaques et musculaires. Ainsi, chez le rat DMDmdx, nous envisageons de tester 1 produit pharmacologique distribué oralement à deux doses données. Un maximum de 48 animaux sera inclus dans ce projet, répartis en 4 groupes expérimentaux. Deux doses différentes (haute dose et dose faible) du composé pharmacologique seront administrées par voie orale à des rats DMDmdx, le véhicule sera administré à des rats DMDmdx et à des rats sains issus de portées communes aux rats DMDmdx (littermates) (groupes contrôles). Les animaux commenceront à recevoir le traitement à partir de l'âge de 6 semaines et jusqu'à l'âge de 7 mois. Au terme de ce traitement, les animaux seront sacrifiés.

Un ensemble de paramètres sera évalué chez tous les animaux pour l'étude des effets du composé (efficacité, éventuelle toxicité) sur les fonctions cardiaque et motrice : suivis hebdomadaires du poids des animaux, mesure de la force d'agrippement (Grip test) et échocardiographies à 6, 12, 18 et 28 semaines d'âge. Ces évaluations permettront de suivre régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets du traitement sur chaque animal. Des prélèvements sanguins seront effectués pour analyses hématologiques et biochimiques et pour la préparation de séra pour analyses des marqueurs circulants de la maladie.

L'approche *in vivo* sera complétée par des techniques *in vitro* d'analyse de la fonction musculaire pour identifier les cibles d'action du composé. Pour cela, une fois les animaux euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés et les propriétés contractiles de faisceaux cellulaires isolés de certains muscles seront notamment analysées. Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau pré-clinique les effets cardiaques et musculaires de ce composé d'intérêt sur le modèle rat de la DMD.

Dans le respect de la règle des 3R, nous REDUIRONS le nombre d'animaux à maximum 12 rats par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience en thérapie pharmacologique et permet

d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Selon les résultats, la totalité des rats ne sera peut-être pas utilisée dans chaque groupe (<12 rats par groupe), point pouvant participer ainsi à la REDUCTION. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis à un facteur suivis de comparaisons multiples par paires ainsi qu'une analyse de variance à deux voies [temps X traitement] pour mesures répétées, associée à un test de comparaisons multiples.

Le REMPLACEMENT d'animaux ne sera pas possible dans cette étude, car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester les effets d'un traitement pharmacologique *in vivo*. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact de ce type de composé dans différents organes au sein d'un organisme entier et donc sur le phénotype de l'animal malade. Malgré tout, nous RAFFINERONS cette étude par un hébergement des animaux selon la réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu systématiquement mis en place (mise à disposition de tunnels en cartons ou PVC, frisottis de papier, bûchettes de bois et hébergement à deux animaux dès que possible). Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie adaptés au modèle rat DMDmdx seront mis en place en fonction des procédures expérimentales (échocardiographies et prélèvements sanguins notamment) : anesthésie à l'Etomidate administré en intrapéritonéal, analgésie à la Buprénorphine administrée en sous cutané si nécessaire. Les Grip tests seront effectués sur animal vigile. L'évolution de la maladie pouvant entraîner un déclin de l'état de santé des rats DMDmdx (difficultés locomotrices, d'alimentation, voire respiratoires), l'état général des animaux sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Ces observations seront automatiquement fournies à un vétérinaire. Un tableau de points limites sera disponible.

13022 Les élevages de poissons sont exposés à de nombreux risques comme les épidémies, la pollution accidentelle des cours d'eau ou la pollution générés par des actes de malveillance, l'agriculture intensive (eutrophisation des cours d'eau), les aléas climatiques exacerbés par le changement climatique (excès de température en été, baisse des débits d'eau, baisse de la qualité de l'eau, tempêtes et inondations en hiver). Pour redémarrer les activités d'élevage en cas de perte de cheptels d'origine ou de lignées obtenues dans les infrastructures de recherches ou les exploitations piscicoles (lignées divergentes pour la recherche ou lignées de sélection pour la production), il est nécessaire de mettre en place une technique de conservation et de régénération. A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de techniques de conservation et de régénération efficaces et fiables des ressources génétiques chez les poissons. La cryoconservation des ovocytes ou des embryons n'est pas possible et la cryoconservation du sperme ne permet pas de régénérer le génome mitochondrial puisque les mitochondries d'origine paternelle sont rapidement éliminées au moment de la fécondation. De même, les techniques de transfert nucléaire ne permettent pas de conserver le patrimoine mitochondrial.

Le projet présenté a pour but de développer la praticabilité et l'efficacité d'une nouvelle biotechnologie qui permet de régénérer des lignées de poissons d'intérêt pour les recherches dans le domaine de l'aquaculture. Cette biotechnologie nécessite la greffe de cellules souches germinales (CSG) dans un embryon receveur au stade éclos rendu préalablement stérile. Seuls les animaux receveurs présentant des gonades colonisées avec les cellules souches germinales greffées pourront générer des gamètes fonctionnels. Le projet cherchera à évaluer s'il est préférable de greffer des cellules souches germinales de mâles (cellules souches spermatogoniales de mâles génétiques ou de néomâles) ou femelles (cellules souches ovogoniales) sexuellement immatures ou matures. Nous testerons également différentes préparations de cellules souches germinales avec des degrés d'enrichissement différents (40 ou 90% d'enrichissement). Le taux de succès des greffes, la production des gamètes, ainsi que la qualité des gamètes seront analysés selon le sexe des animaux receveurs.

Le nombre d'animaux produits au cours du projet et concernés par la réglementation en vigueur sur l'éthique en expérimentation animale sera de 2100 truites.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative *in vitro* à la collecte de cellules germinales souches à partir des gonades d'animaux donneurs malgré les recherches actuelles visant à générer ces cellules souches à partir des cellules souches embryonnaires ou de cellules somatiques adultes (peau). D'autre part, il n'est toujours pas possible de produire des spermatozoïdes *in vitro* et encore moins des ovocytes.

- Réduction : Le nombre d'animaux transplantés et élevés au-delà de la première prise alimentaire est adapté au plus juste pour permettre d'évaluer le taux de succès de la transplantation et les performances de reproduction des animaux transplantés avec succès. Noter que dans ce projet, nous cherchons à évaluer la capacité des cellules souches germinales issues de femelles ovulées pour remplacer l'utilisation de femelles immatures qui possèdent des ovaires de plus petite taille et donc moins riches en cellules souches germinales. Nous espérons pouvoir ainsi diminuer le nombre de femelles à euthanasier pour collecter les cellules souches germinales.

- Raffiner : Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter le stress des animaux manipulés et la douleur éventuellement induite par la piqûre d'injection des cellules souches germinales. D'autre part, nous procéderons rapidement à une euthanasie prématurée en cas de malformations ou de comportements anormaux des animaux transplantés traduisant un mal être.

13023 La radiothérapie est une technique majeure dans le traitement des cancers. Elle consiste en l'utilisation de rayonnements ionisants afin d'induire des dommages de l'ADN létaux pour les cellules tumorales. Malheureusement, chez 1% des patients, des seconds néo-cancers radio-induits se développent en bordure du territoire irradié, notamment des sarcomes au pronostic défavorable. Nous travaillons actuellement sur les mécanismes d'émergence de ces seconds néo-sarcomes, pour, à terme, mettre au point des méthodes pour les prévenir. L'hypothèse que nous testons repose sur le fait que lors d'une radiothérapie, les particules ionisantes qui diffusent depuis le volume irradié vers le tissu sain péri-tumoral pourraient générer au sein des cellules qui le composent des cassures simple-brin de l'ADN. Ces cassures seraient alors susceptibles d'entraîner un vieillissement cellulaire prématuré. Ces cellules auraient alors une probabilité augmentée d'acquies des mutations et donc de générer un second néo-cancer.

La validité de cette hypothèse a été d'ores et déjà testée et démontrée en utilisant des cellules humaines en culture : des fibroblastes de derme. Nous avons montré que des fibroblastes qui se trouvent en marge du volume ciblé par l'irradiation vieillissent prématurément, acquies des mutations et présentent, en tests *in vitro*, des capacités d'invasion. Nous avons donc déjà répondu à l'exigence de remplacement. L'objectif est maintenant d'évaluer la capacité de ces cellules à former un second cancer *in vivo*.

Pour répondre à cet objectif, notre projet consiste à effectuer des essais de tumorigenèse en souris immunodéprimées. Autrement dit, nous souhaitons injecter ces fibroblastes, irradiés en marge, en sous-cutanée dans des souris immunodéficientes (CB17-Scid) et suivre ces souris pour le développement éventuel d'un sarcome. Si un sarcome est détecté, les souris seront sacrifiées pour une analyse histologique des tumeurs formées avant qu'elles n'aient dépassé la taille de 1 cm³. Nous estimons à 120 le nombre de souris nécessaires à la réalisation de ces essais.

Tout a été prévu dans ce projet pour satisfaire au mieux à la règle des 3R : Réduction : le nombre d'animaux a été estimé en se basant sur les données de la littérature, ce qui permet d'estimer au plus juste le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus, il est prévu de pouvoir répéter l'expérience en cas de survenue de problèmes imprévus lors de la première expérience. Raffinement : ce projet sera conduit dans des conditions d'élevage optimales : en animalerie SPF, en portoirs ventilés, avec enrichissement de l'environnement des souris et suivi sanitaire permanent par le personnel de l'animalerie. Les souris seront sacrifiées avant que le volume tumoral ne dépasse 1 cm³. De plus, dans le cas où un phénotype dommageable se développerait au site d'injection ou sur un site éloigné avant ce stade limite ou en cas de tout autre suspicion de souffrance de l'animal objectivable par exemple, par une perte de poids excessive, les souris seront sacrifiées prématurément. Malheureusement, il n'est pas possible

de Remplacer ces modèles animaux. La souris immunodéprimée est le modèle de référence pour étudier le potentiel des cellules à former des tumeurs.

13024 Ce projet se place dans le cadre d'un module d'enseignement proposé par l'Université pour les étudiants de Master 1 qui veulent se spécialiser en Neurosciences. L'objectif pédagogique de ce module est de leur donner les connaissances théoriques et pratiques nécessaires pour comprendre la neurophysiologie des systèmes complexes qui sous-tendent des comportements normaux (exemple la motivation, la peur), pour ensuite comprendre comment le dysfonctionnement de ces systèmes peut conduire à des pathologies (exemple l'addiction, l'anxiété) et enfin étudier l'influence de certaines substances pharmacologiques sur ces comportements. Ce projet portant sur des comportements complexes, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

La plus-value principale de ce projet pédagogique et de ce module est de permettre aux étudiants d'être confrontés à la complexité du travail sur l'animal vivant.

L'aspect le plus dommageable du projet est l'injection intra-péritonéale d'une substance pharmacologique, intervention considérée de classe légère. L'injection sera suivie de la réalisation de 3 tests comportementaux évaluant les aspects de type anxiété, dépression, coordination et activité locomotrice. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur même si, en principe, aucune douleur n'est induite par les procédures utilisées. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (arrêt des tests comportementaux et suppression de la douleur grâce à l'administration d'antalgiques).

Le projet est composé de quatre procédures expérimentales et requerra l'utilisation de 160 rats sur 5 ans. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience et permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. D'autre part, il sera possible de réaliser différents traitements sur les mêmes animaux sans interférer avec les résultats de l'expérience et le bien-être de l'animal, ce qui permet de diminuer d'autant le nombre d'animaux requis.

13025 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) fait partie des cancers les plus mortels et les plus répandus dans la population humaine. Les rares médicaments qui existent ne permettent malheureusement pas de guérir les patients. Dans 9 cas sur 10, le cancer se développe dans les foies déjà malades de patients souffrant d'hépatites aggravées en cirrhose. Ces hépatites peuvent être d'origine virale, ou liées à la consommation excessive d'alcool ou encore de régime riche en graisses. Afin de pouvoir étudier le développement de cette maladie, une équipe japonaise a trouvé les conditions d'alimentation de souris diabétiques qui développent alors un cancer du foie comme chez l'Homme. Des données de la littérature scientifique suggèrent que la molécule TRIM21 jouerait un rôle suppresseur de tumeur dans le cancer du foie. Notre projet est d'étudier le rôle de cette protéine dans le cancer du foie en comparant le développement de cancer chez des souris normales et des souris n'exprimant pas ce facteur TRIM21. Pour atteindre le stade cancéreux, le protocole devra durer 27 semaines, les animaux seront étudiés après 1, 3, 5, 7, 9, 12, 16, 20 et 27 semaines de traitement pour comparer les évolutions de la maladie chez les différents types d'animaux. Les organes prélevés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique, les dysfonctionnements métaboliques et l'avancée du cancer. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 512, nous avons pensé ce protocole en respectant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ;

- L'étude a été raffinée en engageant un suivi fréquent des souris rendues diabétiques (change 2 à 3 fois par semaine pour leur donner un environnement sec), et un grand nombre de mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 3 organes touchés par la maladie pour récolter un maximum

d'informations que nous pourrions corrélérer aux résultats des études partielles menées chez l'homme.

- Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.

Ce travail permettra de préciser le rôle de la protéine TRIM21 dans l'évolution de la stéatose hépatique inflammatoire conduisant au cancer du foie chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies préventives du cancer.

13026 A l'échelle mondiale, la tuberculose est un problème majeur de santé publique. Les infections liées à *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) représentent chaque année, 12 millions de personnes atteintes, dont 3,9 millions sont contagieuses. En 2016, le nombre de décès dus à la tuberculose était estimé à 1,7 millions. Si l'on ne fait rien contre la tuberculose au cours des vingt prochaines années, près d'un milliard de personnes supplémentaires seront infectées, 200 millions contracteront la maladie et 35 millions en mourront.

En outre, on observe chaque année 630 000 cas de tuberculose résistante aux traitements. Ces formes de la maladie sont observées en majorité en Europe de l'Est et dans certaines provinces de Chine, en Afrique et en Amérique du Sud. Il est donc urgent de relancer activement la recherche pour des médicaments plus efficaces, simples d'utilisation et, surtout, à la portée des malades des pays en voie de développement. Notre objectif est donc de fournir des médicaments innovants, de réduire le temps de traitement actuellement de 6 mois et de trouver des solutions de santé adaptées pour combattre la menace grandissante de la tuberculose.

Dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie *in vivo* demeure indispensable. En effet les tests *in vitro*, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôte (le patient) / pathogène (la bactérie). La diversité des stades cliniques de tuberculose (latent, active) nécessite le développement de différents modèles animaux pour simuler la physiopathologie associée à ces formes cliniques. La caractérisation de certaines cibles cellulaires impliquées dans l'immunité peut également entraîner l'utilisation de souris transgéniques.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires des pays destinataires des produits n'est développée à ce jour pour les procédures expérimentales décrites.

Réduction : Le schéma expérimental des tests de ce projet a fait l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en permettant un support au dossier réglementaire CTD (Common Technical Document).

Raffinement: Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement, dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé et compétent. A chaque fois que cela est possible, des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs. Le projet nécessitera un maximum de 16000 rongeurs, soit 3200 par an, pendant 5 ans.

13027 Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est une pathologie de la grossesse dont la fréquence et la gravité sont largement sous-estimées. Souvent associé à la prématurité qu'il aggrave, le RCIU, qui peut toucher jusqu'à 10 à 15 % des naissances, est grevé d'une augmentation importante de la mortalité in utero et néonatale. Chez les enfants survivants, le RCIU peut induire des pathologies et handicaps graves, touchant pratiquement tous les organes, dont le système respiratoire, la plupart des organes vitaux (rein, cœur, foie) et, tout particulièrement, la sphère neurologique. Face à ce problème majeur de santé publique, les moyens d'intervention médicale sont aujourd'hui limités. Même si les hypothèses expliquant cette pathologie sont de plus en plus nombreuses, et

pointent en particulier vers un déficit de la fonction placentaire, les mécanismes profonds de la formation et de la progression du RCIU restent ignorés.

Nous aimerions utiliser un modèle simple de RCIU chez le rat : les rates gestantes sont soumises à un régime pauvre en protéines durant toute leur gestation (croquettes à 8% de protéine au lieu de 23% chez les animaux contrôles). Ces rates donnent des ratons atteints de RCIU. Ce modèle mime très bien chez les ratons les atteintes retrouvées chez les nouveau-nés RCIU humains : retard de croissance, déficit de maturation des oligodendrocytes (cellules responsables de la production de myéline, substance importante pour la conduction nerveuse), fragilisation des cellules microgliales (cellules immunitaires résidentes du cerveau), problèmes de connectivité cérébrale...

Afin de mieux comprendre comment se forment ces lésions cérébrales, nous aimerions mener des investigations sur ce modèle. L'hypothèse de ce projet est que le RCIU est dû à un problème de division et/ou de migration cellulaire lors du stade embryonnaire. L'objectif de l'étude sera donc de marquer les cellules en cours de division à l'aide d'une molécule injectée intrapéritonéalement (i. p.) chez les femelles gestantes. Cette molécule s'incorporera seulement aux cellules en division et sera par la suite marquée de manière fluorescente. Ainsi nous pourrions comparer le nombre de cellules en division chez les ratons normaux et les ratons RCIU.

Nous aimerions également nous intéresser au devenir de ces cellules et suivre leur migration dans le cerveau. Nous effectuerons donc des euthanasies à différents points temporels pour définir si des différences de migrations sont présentes entre les 2 groupes. Enfin, nous aimerions comparer le temps que mettent les cellules à se diviser dans les deux groupes d'animaux. Pour cela, 4 femelles gestantes subiront également une injection i. p. d'une autre molécule qui s'incorpore aux cellules en division et qui sera marqué par la suite avec une autre molécule fluorescente. Les injections se feront chez la rate gestante vigile, à l'âge embryonnaire E16 et les âges d'euthanasie et d'analyse des cerveaux seront : âge embryonnaire E16, E17, E19, et âges postnataux : à P0 (naissance) et à 10 jours de vie (P10). Après mise bas, les rates seront euthanasiées à la fin de l'étude. Des critères d'arrêt ont été définis et seront utilisés (points limites : pour les ratons : si pas de prise de poids d'un jour sur l'autre et pas de visibilité de la poche à lait. Pour les rates : si perte de plus de 20% du poids).

Nombre d'animaux utilisés : il est prévu d'utiliser 20 rates gestantes, 48 fœtus et 32 ratons. Soit un nombre total de 100 animaux. Nous désirons mener le projet sur 3 ans.

Afin de respecter la règle des 3R notre projet comprend :

- remplacer : désirant étudier le développement cérébral général, il nous paraît impossible de remplacer les expérimentations *in vivo* de cette étude par des expérimentations alternatives. En effet, le tissu cérébral est extrêmement complexe et de nombreuses cellules différentes sont en interaction lors de son développement. A notre connaissance, il n'existe pas de modèle *in-vitro* suffisamment représentatif pour le développement cérébral.

- réduire : pour utiliser le nombre d'animaux juste pour cette étude nous nous sommes basés sur les résultats des études antérieures sur ce modèle. Il s'avère que la quantité de 8 animaux / groupe est la quantité adéquate pour nos analyses. Une fois les données relevées, les tests statistiques prévus sont le Mann - Whitney test pour la comparaison des 2 groupes.

- raffiner : Le modèle RCIU utilisé est non invasif et repose seulement sur la mise à disposition d'une nourriture hypoprotidique pour les rates gestantes.

Les animaux seront suivis par le personnel qualifié de l'animalerie, avec attention à l'aspect, la mesure du poids et de la quantité de nourriture ingérée pour les femelles gestantes et attention à l'aspect et mesure du poids pour les ratons. La surveillance est effectuée chaque jour weekend compris.

13028 Comme chez toutes les femelles de mammifères, après la mise bas, les vaches laitières mobilisent une partie de leurs réserves corporelles adipeuses pour assurer la production de lait. En effet, la production de lait nécessite de l'eau, de l'énergie, des protéines, des minéraux, que la vache prélève d'abord dans son alimentation et son abreuvement. Mais en début de lactation, l'appétit de l'animal est limité, sa capacité à manger (appelée capacité d'ingestion) est insuffisante et les aliments

consommés ne peuvent suffire à la satisfaction des besoins. Ce déséquilibre naturel entre production et consommation est alors compensé par l'animal. Une partie de l'énergie contenue dans le lait produit provient des réserves corporelles, notamment lipidiques. Ces réserves corporelles sont ensuite reconstituées, en fin de lactation lorsque la production laitière diminue, et que l'appétit est plus conséquent, pour assurer le début de lactation suivante.

L'importance, au sens de la durée et l'intensité, de cette mobilisation varie entre vaches. Elle varie notamment entre races de vaches. Mais elle varie aussi entre vaches d'une même race selon l'état de ces réserves (plus un animal est gras, plus il aura tendance à mobiliser), l'aptitude à produire du lait (plus le potentiel laitier est élevé, plus la vache mobilise ses réserves), la capacité d'ingestion (plus la vache mange, moins elle mobilise ses réserves) et la qualité de la ration au sens notamment de sa teneur en énergie. Toutes les vaches ne sont pas égales face à ce phénomène. De plus, cette mobilisation, si elle dure trop longtemps ou si elle s'avère trop importante, peut avoir des conséquences négatives en matière d'aptitude à la reproduction, voire de santé. Or, avec une durée de gestation de 9 mois, et le souhait d'un veau par an, la période de reproduction chez la femelle bovine se déroule en début de lactation. La vache et l'éleveur doivent donc gérer simultanément et si possible avec succès les 2 fonctions (lactation et reproduction). Une vache qui ne serait pas apte à produire et se reproduire dans le temps imparti verra sa durée de vie réduite. Il importe donc de mieux contrôler, piloter ces réserves corporelles et notamment cette perte d'état corporel en vue de la limiter. Et pour ce faire, de mieux les décrire, d'en analyser les déterminants, et notamment leur reconstitution lors de la lactation précédente et d'en comprendre donc les relations avec l'alimentation. A quel moment de la lactation est-il préférable d'apporter des compléments alimentaires énergétiques (concentrés) dans la ration pour limiter cette mobilisation au strict nécessaire ? Ainsi, au-delà de la conduite classiquement pratiquée en élevage, des apports alimentaires supplémentaires et différenciés dans le temps seront attribués aux vaches des différentes races.

Le principe des 3R a été mis en œuvre dans la conception de cette expérimentation.

Remplacement : Ces travaux concernant spécifiquement la femelle laitière bovine de différentes races, sur plusieurs lactations, empêchent toute substitution possible qui dénaturerait la réponse à la question posée.

Réduction : La réalisation de l'expérience sur plusieurs années, avec des animaux qui réalisent plusieurs lactations consécutives permet de réduire le nombre total d'animaux mobilisés tout en conservant un effectif compatible avec la mise en évidence statistique des phénomènes biologiques que l'on cherche à mieux maîtriser. Au total durant les 5 années d'expérimentation, 390 vaches laitières seront utilisées. Elles permettront d'obtenir environ 750 lactations.

Raffinement : Les conditions d'élevage, d'hébergement, d'alimentation, notamment au pâturage, de traitement des vaches et génisses sont caractéristiques des conditions classiques d'élevage et pas modifiées par la mise en œuvre du protocole présenté. Seules des prises de sang en nombre limitée, espacées dans le temps, et réalisées sous la queue, dans la veine caudale constituent la méthode invasive appliquée dans cette expérimentation.

13029 Les troubles du spectre autistique ou TSA affectent la personne en termes de communication verbale et/ou non verbale, d'interactions sociales et se manifestent par des centres d'intérêt restreints et des stéréotypies. La schizophrénie à début précoce touche les patients avant l'âge de 18 ans et la schizophrénie à début très précoce avant l'âge de 13 ans. Les études s'accordent sur une prévalence de 0,03% de la population générale, mais les formes de schizophrénie précoce et très précoce dans leur totalité représentent 20% des schizophrénies. Les liens entre ces deux pathologies ne sont pas encore bien connus, mais certaines données de la littérature font état d'un risque évolutif important de certaines formes de troubles du spectre autistique vers la schizophrénie très précoce. Ces deux types de troubles sont des maladies neuro-développementales graves. Différents travaux ont pu montrer que de plus en plus de gènes impliqués dans l'autisme jouent également un rôle dans la physiopathologie de la schizophrénie précoce, et vice versa.

Une étude réalisée sur 10 patients atteints de schizophrénie précoce et d'autisme et leur famille a permis d'identifier 4 gènes (GC1, GC2, GC3 et GC4) potentiellement importants dans le développement de ces pathologies. Nous voudrions donc étudier le rôle de ces gènes dans la migration des neurones corticaux (altération souvent associée à la schizophrénie) et dans le développement des épines dendritiques (altération souvent associée aux troubles du spectre autistique et au retard mental). De plus, nous réaliserons une étude comportementale afin d'étudier l'impact de ces gènes sur le comportement social chez le jeune afin de vérifier qu'ils sont bien la cause des troubles du spectre autistique ou de la schizophrénie observée chez les jeunes patients. Si nous confirmons ces gènes comme cause de ces pathologies, cela nous permettra d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques en lien avec les mécanismes biologiques impactés par ces gènes. Une technique chirurgicale nous permettra d'insérer les gènes mutés ou le gène que nous voulons surexprimer dans le cortex des embryons de souris 12 jours ou 14 jours après le début de la gestation. Ces deux stades de développement nous permettront d'étudier l'impact de ces gènes sur différentes couches du cortex. Nous récupérerons les embryons ainsi modifiés 17 jours après le début de la gestation afin d'étudier la migration radiale des neurones corticaux et la morphologie des épines dendritiques.

Dans un second temps, nous introduirons les mêmes gènes dans les embryons 12 ou 14 jours après le début de la gestation dans le but de laisser naître les souriceaux et d'étudier leur comportement social à travers différents tests.

Pour réaliser cette étude, nous prévoyons d'utiliser un total maximum de 576 souris, nombre qui pourra être diminué selon le nombre d'embryon électroporés avec succès.

Remplacement : Tous les tests de bon fonctionnement des plasmides ainsi que des études préliminaires sur la différenciation neuronale ont été réalisés sur des cultures cellulaires afin de remplacer au maximum les animaux.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous réalisons plusieurs tests de comportement social sur les mêmes animaux, et nous récupérons leur cerveau afin de réaliser une étude morphologique et moléculaire des mécanismes mis en oeuvre en absence ou présence des gènes étudiés. De plus, comme nous étudions les animaux jeunes, donc non matures sexuellement, nous étudierons aussi bien les mâles que les femelles, ce qui permettra de réduire à la fois le nombre de femelles opérées et le nombre d'embryons électroporés. Les tests statistiques utilisés nous permettront d'utiliser le minimum d'animaux tout en ayant des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Enfin, pour garantir le raffinement, les animaux sont hébergés en groupes sociaux adaptés à leur fonctionnement social et disposent d'éléments d'enrichissement (cabanes, bâtons à ronger). Les femelles opérées seront hébergées individuellement et tenues au chaud avant et après le réveil, et recevront des analgésiques en cas d'inconfort.

Le but de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes en oeuvre au niveau du cortex pendant le développement embryonnaire chez les patients atteints de schizophrénie précoce et d'autisme, et d'identifier ainsi de nouvelles pistes thérapeutiques. De plus, la compréhension de ces mécanismes biologiques pourrait également permettre d'identifier des biomarqueurs qui permettront d'aider au diagnostic de ces pathologies.

13030 *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) est une bactérie qui infecte de façon chronique les poumons de personnes immuno-déprimées ou atteints de mucoviscidose. Dans cette dernière, Pa est un facteur aggravant de la pathologie. Une fois dans les poumons, Pa forme des biofilms, sortes de sécrétions dans lesquelles les bactéries se multiplient à l'abri du système immunitaire et de l'atteinte d'antibiotiques. Enchâssée dans ce biofilm, la concentration en oxygène diminue à mesure de la profondeur et la bactérie se retrouve dans un environnement dépourvu d'oxygène (condition anaérobie). Malgré l'absence d'oxygène, la bactérie survit et est capable de se multiplier. Nous avons identifié 3 gènes impliqués dans ce processus de survie sans oxygène et avons construit 3 mutants, chacun dépourvu d'un des 3 gènes. Nos résultats *in vitro* montrent que la bactérie n'est plus capable de se multiplier sans oxygène, lorsqu'un des 3 gènes est désactivé. Nous aurions

besoin maintenant de démontrer que l'absence de l'un de ces 3 gènes empêche également la bactérie de se multiplier dans un environnement pulmonaire. Pour cela, nous souhaitons développer un modèle d'infection pulmonaire chronique, non mortel, à Pa, en administrant directement en intra pulmonaire des bactéries Pa. Nous anticipons que les bactéries mutantes sur l'un des gènes identifiés ne seront plus capables de se multiplier. Ce travail permettra de valider ces 3 gènes comme cibles thérapeutiques pour éradiquer les infections chroniques à Pa chez les patients mucoviscidose ou immunodéprimés.

Ce projet nécessite 198 souris au maximum, pour tester l'ensemble des 3 mutants. Ce projet suit la règle des 3 R. En effet, tous les tests *in vitro* préalables ont été réalisés, nous ne pouvons donc pas REMPLACER notre modèle car nous avons maintenant besoin de valider notre concept *in vivo*. Au niveau du RAFFINEMENT, les animaux évolueront dans des environnements enrichis, et seront anesthésiés lors de l'implantation des bactéries en intra pulmonaire. Des analgésiques seront également administrés pour éviter toute douleur post opératoire, et/ou liée à l'infection. Leur poids et leur température, indicateurs de santé, seront également suivis de façon rapprochée et l'expérience sera interrompue pour les animaux qui ne supporteront pas l'infection chronique. De plus nous REDUIRONS au minimum le nombre d'animaux en menant les expériences de façon séquentielle pour arrêter dès que les statistiques seront satisfaisantes.

13031 La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par des pertes de mémoire et de fonctions physiologiques associées à l'accumulation de protéines dans le cerveau. Les peptides β amyloïdes ($A\beta$) modifient le fonctionnement des neurones, s'accumulent à l'extérieur des neurones et forment des plaques, ils modifient également l'état d'autres protéines: les protéines tau qui s'accumulent à l'intérieur des neurones et les tuent. Cependant, chez certains patients la présence importante de plaques ne provoque pas de déficit cognitif. Pour expliquer cette résistance à la maladie, il a été proposé que les réseaux neuronaux fortement sollicités qui produisent beaucoup de peptides $A\beta$, puissent être remplacés par des circuits neuronaux alternatifs pouvant retarder le déclin cognitif. La structure et la physiologie de ces nouveaux réseaux restent inconnues, étudier leur mise en place et leur résistance à la MA offre de nouvelles perspectives de traitement.

Pour valider la mise en place de réseaux alternatifs au cours du développement de la MA ou du vieillissement cognitif et comprendre le rôle des peptides $A\beta$ dans cette réorganisation, nous proposons une étude électrophysiologique *in vivo* sur des souris transgéniques modèles de la MA et des souris âgées. Au cours de cette étude, nous allons tester les effets d'une molécule qui est capable de réduire les peptides $A\beta$ et d'améliorer les déficits cognitifs sur le fonctionnement des réseaux neuronaux.

Au total, nous avons besoin de 600 souris. Les expériences seront menées sur mâles et femelles en parallèle afin de comparer les effets sur les 2 sexes et afin de Réduire les productions d'animaux. Nous ne pouvons pas Remplacer tout ou partie de ces études par des tests *in vitro* ou sur cellule car nos expériences requièrent les capacités mnésiques de l'animal et l'intégrité des réseaux hippocampo-corticaux. Nos expériences ont été conçues et Raffinées en optimisant les informations obtenues sur chaque souris et en veillant au bien-être animal à chaque étape. Des points limites et critères d'interruption sont observés tout au long de nos procédures afin de veiller au bien-être des animaux et à l'interprétation de nos résultats.

13032 Un facteur limitant l'accès des agents anti-cancéreux au cerveau, pour le traitement du glioblastome (maladie incurable à ce jour), est la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière, constituée de cellules au niveau du compartiment vasculaire, bloque le passage de certains agents anti-cancéreux du compartiment sanguin vers les cellules du cerveau. Nous disposons d'un appareil adapté aux petits animaux permettant une ouverture temporaire et localisée de la BHE par ultra-sons. Ainsi la barrière peut être très localement rompue par application d'ultrasons, uniquement au niveau de la tumeur. Il en résulte un passage des agents anti-cancéreux uniquement vers le site tumoral en épargnant le tissu sain cérébral environnant (moins d'effets secondaires). Ce procédé de rupture de la BHE est non invasif, et réversible.

Nous avons démontré au laboratoire l'innocuité et l'internalisation des nanoparticules métalliques (NP), sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses *in vitro* ainsi que chez la souris. Il a par ailleurs été démontré qu'une stimulation lumineuse (par laser) de ces nanoparticules provoque localement au niveau de la tumeur une élévation de la température induisant un effet anti-tumoral (thérapie par photothermie). Cette hyperthermie locale peut être monitorée de manière non invasive de façon à induire un traitement anti-tumoral sans douleur ou effet secondaire chez l'animal. Dans ce présent projet, nous souhaiterions provoquer chez l'animal porteur d'une tumeur de glioblastome, la pénétration de ces nanoparticules au niveau tumoral, en forçant leur passage à travers la BHE vers la tumeur, par une application localisée d'ultrasons. Les nanoparticules ainsi concentrées dans la tumeur seront ensuite activées par stimulation photothermique afin d'induire un effet anti-tumoral.

1) Dans un premier temps nous vérifierons d'abord l'efficacité anti-tumorale de la photothermie sur des tumeurs de glioblastome sous-cutanées (sur souris Athymic nude foxn-1). Les NP seront ici directement administrées dans la tumeur, puis la photothermie sera induite. Après ces traitements, les tumeurs seront prélevées pour une analyse histologique des effets anti-tumoraux. Si la photothermie n'a aucun effet à ce stade-là, le projet prendra fin (en effet ; il ne sera pas nécessaire de tester l'efficacité du passage des NP dans le cerveau au moyen d'ultrasons, si les NP n'ont pas d'effet anti-tumoral).

2) Nous procéderons à un dosage dans le sang (étude pharmacocinétique) de ces nanoparticules à différents temps chez l'animal sain, après administration intraveineuse. Cette étude nous permettra de déterminer la durée de circulation des NP dans le sang après leur administration. Le but est ici de savoir à quel moment il faudra appliquer les ultrasons (dans les procédures qui suivent) pour une pénétration maximale des NP dans la tumeur. Ces études seront conduites sur des souris Athymic nude foxn-1 saines.

3) L'étape suivante consistera à valider l'efficacité de l'application d'ultrasons pour le passage des NP vers la tumeur et à déterminer, juste après l'application d'ultrasons, le temps que nous devons attendre pour qu'un maximum de NP puisse s'accumuler dans la tumeur. C'est au bout de ce temps-là que nous appliquerons le laser dans l'étape suivante (photothermie) pour provoquer l'échauffement des NP et donc l'hyperthermie. Pour cela nous utiliserons un modèle courant de souris athymic nude foxn-1 porteuses de tumeurs de glioblastome U87-MG (greffe orthotopique).

Les animaux seront traités 1 semaine après la greffe tumorale par injection intraveineuse avec les formulations suivantes : 1) solvant, 2) NP. Les animaux de chaque groupe seront ensuite traités par ultrasons, ou sans ultrasons. Nous obtenons donc 4 conditions de traitement au total. Les animaux de chacune des 4 conditions seront euthanasiés à différents temps après le traitement et les cerveaux disséqués, afin d'évaluer la quantité de NP présentes dans la tumeur.

4) Enfin la dernière étape consistera à évaluer l'efficacité anti-tumorale de la thérapie par photothermie. Des souris athymic nude foxn-1 seront de nouveau greffées par voie orthotopique avec des cellules de glioblastome U87-MG, comme précédemment. Les animaux seront tous traités 1 semaine après la greffe par une injection intraveineuse des formulations suivantes :

1) solvant, 2) NP, et soumis à une application d'ultrasons au temps post-injection i. v. défini dans l'étude pharmacocinétique. Ensuite, une illumination laser sera appliquée ou non sur le crâne des animaux, au temps défini dans l'étape précédente, pour induire l'hyperthermie des NP et par conséquent l'effet anti-tumoral. Des animaux seront euthanasiés 21 jours après la greffe tumorale pour analyser la taille des tumeurs par histologie et une étude de survie sera également menée.

Au total, un maximum de 255 souris est prévu pour la globalité de l'étude.

La progression tumorale sera estimée à travers une surveillance et une mesure quotidienne du poids des animaux. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou à l'apparition de troubles neurologiques (d'après une feuille de score) les souris seront immédiatement euthanasiées. Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Il est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 5 individus

par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Suite au traitement avec les NP, nous serons attentifs au bien-être des animaux en observant tout changement dans leur comportement ou apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à respirer, à se déplacer, ataxie). Si de tels signes cliniques apparaissaient, les animaux seront euthanasiés sans délai.

13033 Des études expérimentales chez le porc, comme l'étude de certains pathogènes, le contrôle de vaccins ou la production de sérums ou d'organes sont réalisées sur des animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS). Ces porcs EOPS naissent par voie naturelle d'une truie elle-même indemne de pathogènes spécifiés ou à la suite d'une césarienne. Les porcelets issus de cette césarienne sont transférés, dans des conditions aseptiques, vers un élevage confiné dont les intrants sont contrôlés afin de réduire le risque de contamination externe. L'asepsie lors de la césarienne est obtenue en la réalisant sur un utérus isolé par une opération d'hystérectomie et ouvert dans un isolateur stérile dont l'atmosphère est filtrée.

Cette saisine se situe dans le prolongement d'un précédent projet. L'objectif de ce dernier était d'optimiser l'inconscience de la truie soumise à une opération d'hystérectomie, tout en préservant le réveil de ses porcelets. Peu de données bibliographiques sont disponibles sur l'anesthésie de la truie et le réveil des porcelets. Dans ce projet, l'administration associée d'anesthésique par voie veineuse et gazeuse a été étudiée mais uniquement sur 4 truies. Nos résultats montrent que cette combinaison doit être privilégiée. Nous souhaitons étendre la procédure 1 du projet initial ("Validation du protocole anesthésique sur truies gravides, ajustement des doses et technique d'administration") sur un nombre de truies plus conséquent, soit 6 truies gravides, minimum requis pour valider un protocole qui sera mis en œuvre ultérieurement pour la production de certains de nos animaux EOPS.

Nous avons tenu compte de la règle des 3 R, c'est-à-dire Réduction : ce projet sera réalisé sur un maximum de 6 truies et leurs 15 porcelets en moyenne, soit 96 animaux, nombre qui a été réduit au minimum, pour prendre en compte une variabilité individuelle de réaction à l'anesthésie ; Raffinement : le but est d'éviter toute souffrance aux truies lors de l'opération tout en préservant la survie des porcelets ; Remplacement : la truie étant la cible directe de cette procédure, le recours à l'expérimentation animale est indispensable et le remplacement n'est pas possible.

13034 Incontinentia pigmenti (IP) est une maladie génétique rare liée au chromosome X. Elle est létale très tôt au cours du développement embryonnaire chez les garçons. Elle se caractérise chez les filles par une inflammation cutanée sévère dès la naissance et, de façon très variable, des anomalies oculaires, dentaires et cérébrales, celles-ci pouvant conduire à une paralysie et à un déficit intellectuel. Le gène altéré dans l'IP a été identifié. Il code la protéine NEMO, qui joue un rôle essentiel dans une multitude de situations physiologiques dont la protection contre la mort cellulaire. Le but du projet est de tester l'effet sur l'IP de deux agents pharmacologiques dont certaines études ont démontré un rôle d'inhibiteur de la mort cellulaire : la phénytoïne, déjà utilisée comme traitement antiépileptique chez l'Homme, et RIPA-56. Aucun modèle *in vitro* ne reproduit la maladie et ne permet de tester l'effet de ces médicaments sur un organisme. Le recours à des modèles animaux est nécessaire. Un modèle rongeur transgénique (muté sur le gène Nemo) mime pathologiquement et génétiquement la situation humaine. Nous l'utiliserons.

Des souris femelles, produisant des individus chez qui le gène Nemo ne s'exprime pas ou peu, seront traitées durant leur gestation par la phénytoïne ou RIPA-56. Les atteintes cérébrales et cutanées des souriceaux de leurs portées seront comparées à celles des souriceaux des portées de femelles elles aussi transgéniques mais non traitées. L'analyse cérébrale sera réalisée en utilisant la technique d'imagerie par Résonance Magnétique (IRM), non invasive, pour détecter des anomalies au niveau de la matière grise et l'analyse cutanée sera réalisée de visu et par analyse d'échantillons de peau en classant les animaux selon 3 phénotypes (absent, modéré et sévère).

Les 225 animaux étudiés dans ce projet qui durera 2 ans, sont nés et élevés dans des élevages agréés. Ce nombre a été défini comme minimum nécessaire pour garantir la pertinence statistique de l'analyse des données.

Les animaux seront observés quotidiennement par une équipe de zootechniciens en charge de leurs soins durant la gestation des femelles traitées et de manière plus accrue lorsque la pathologie cutanée des nouveau-nés commencera à se développer. Des critères d'arrêt très précis ont été déterminés pour intervenir en cas de signe de souffrance. Leur hébergement en groupe sociaux dans des cages enrichies d'objets en accord avec la réglementation sont mis en place pour améliorer leur bien-être.

13035 Ce projet s'inscrit dans une démarche translationnelle entre le développement préclinique et le développement clinique pour une visée thérapeutique dans le contexte de la leucémie aigüe. Il se concentre sur l'évaluation préclinique et l'accompagnement du développement clinique d'un nouveau traitement inducteur de mort cellulaire dans les leucémies (cancer du sang). Cette nouvelle molécule déjà testée dans le cancer du sein paraît intéressante pour traiter les leucémies. Les résultats *in vitro* au laboratoire indiquent que cette molécule est active sur les lignées cellulaires leucémiques et sur des cellules de patient traitées *ex-vivo* ce qui induit la mort cellulaire. De plus il a été mis en évidence des effets accrus lorsqu'elle est utilisée avec des thérapies anti-leucémiques conventionnelles. En effet cette molécule permet d'améliorer l'efficacité des traitements de référence seuls.

Pour mener à bien ce projet, nous allons mettre en place un modèle murin développant une leucémie humaine, modèle expérimental se rapprochant le plus de la pathologie humaine. Pour cela, des souris dépourvues de système immunitaire, afin d'éviter tout rejet de greffe, vont recevoir par voie intraveineuse une injection d'une lignée cellulaire leucémique humaine (2 lignées différentes seront testées afin d'éprouver la pertinence des résultats obtenus). Dans un second temps, ces souris recevront, par voie intra-péritonéale ou orale (gavage avec une sonde souple) ou intra veineuse les différents traitements seuls ou combinés les uns aux autres. Ces traitements correspondent à la molécule que nous souhaitons évaluer dans la leucémie aigüe, et aux deux agents étant utilisés classiquement pour soigner les patients atteints de leucémie aigüe. Les traitements par gavage seront donnés 5 jours par semaine pendant 3 semaines, le traitement par voie intrapéritonéale sera donné 5 jours par semaine pendant la première semaine seulement, et enfin le traitement par voie intraveineuse sera donné une fois par semaine pendant 3 semaines ; aucun moyen de délivrance des traitements n'entraînera de la douleur et par conséquent ne nécessitera l'anesthésie préalable des souris. Le traitement débutera 3 jours après l'injection des cellules tumorales. L'efficacité des stratégies thérapeutiques utilisées sera évaluée par suivi de la présence des cellules tumorales dans le sang de manière hebdomadaire par prélèvement de quelques gouttes de sang dans la veine mandibulaire ; cet acte ne sera pas non plus réalisé sous anesthésie

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* afin de valider l'efficacité de notre molécule thérapeutique, seule ou en combinaison. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle *in vivo* intégrant la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrières limitant l'efficacité des traitements. De plus cette étude est un préalable indispensable à toute utilisation en médecine humaine. Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 320 souris, sur une durée de 2 ans pour répondre au besoin du projet. En effet 10 souris par groupe sont nécessaires pour avoir une puissance statistique interprétable, il y a 8 groupes par expérience (groupe contrôle = 1, groupes avec chaque molécule seule = 3, groupes avec l'association de deux molécules = 3, groupe tri-thérapie = 1), L'expérience sera faite deux fois (pour valider la reproductibilité des résultats), et il y a deux modèles (deux lignées cellulaires différentes utilisées).

Une attention toute particulière sera portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints

conduisent à l'euthanasie de la souris. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 4 mois après l'injection des cellules tumorales, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

13036 L'objectif du projet est de comprendre sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (souris) les propriétés des réseaux neuronaux qui sous-tendent l'encodage, le traitement et le stockage des informations ainsi que les déficits cognitifs associés aux principales pathologies cérébrales. Dans ce projet, nous allons utiliser des techniques de biologie moléculaire permettant de manipuler l'expression d'une protéine de la polarité planaire, Vangl2, qui non seulement participe au développement cortical (neurogénèse, guidage axonal, formation des synapses), mais est aussi fortement exprimée chez l'adulte dans la région hippocampique, dont elle semble moduler la fonction et l'implication dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Nous allons mener des investigations électrophysiologiques pour comprendre le rôle de Vangl2 dans le fonctionnement du circuit de l'hippocampe. Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies, ce qui représente un intérêt sociétal considérable. Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif *in vitro* ou *in silico*. Nous avons opté pour l'utilisation de la souris car ces rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les désagréments pour les animaux, liés aux conditions d'élevage ou d'expérimentation. Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 120 souris, réparties sur une période de projet de 5 ans.

Les animaux utilisés sont des souris de lignées transgéniques qui expriment un marqueur moléculaire permettant de cibler spécifiquement les neurones, et de leur faire exprimer ou au contraire de réprimer l'expression de la protéine Vangl2. Il devient ainsi possible de tester des hypothèses quant au rôle de cette protéine dans le circuit de façon causale (que se passe-t-il quand on active ou quand on bloque expérimentalement l'expression de vangl2 dans telle ou telle population spécifique de neurones) et non plus seulement corrélative (quand cette protéine est-elle exprimée). Les marqueurs moléculaires spécifiques des lignées utilisées ne sont pas associés à un phénotype dommageable, et sont donc sans conséquence sur leur bien-être. Pour supprimer l'anxiété, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage enrichie avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. De plus concernant la procédure de chirurgie, une analgésie préalable, le mode d'anesthésie (gazeuse + locale) ainsi que le suivi-post opératoire permettent de réduire au minimum l'inconfort et la douleur de l'animal.

13037 Les affections ostéoarticulaires chroniques ou rhumatismales sont chez l'homme la première cause de morbidité au monde en touchant environ 20% de la population et tout particulièrement les adultes de plus de 50 ans. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique par de l'inflammation entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité. Les deux maladies rhumatismales les plus fréquentes sont l'arthrose (ou ostéoarthrite) et l'arthrite rhumatoïde (AR). L'arthrose est causée par la dégénération des articulations due à une usure progressive du cartilage. En plus de cette usure, l'arthrose est associée à un remodelage des os sous cartilagineux, la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes), un affaiblissement des ligaments et des muscles et dans les cas les plus sévères, une inflammation articulaire.

Les traitements des maladies rhumatismales sont basés principalement sur le soulagement de la douleur intense et de l'inflammation : traitements antalgiques et analgésiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens ou anti-inflammatoire de type corticoïdes, des traitements immunosuppresseurs ou encore les biothérapies ciblant les cytokines pro-inflammatoires. Si l'inflammation peut être contrôlée chez certains patients, il n'existe malheureusement à ce jour, aucun traitement permettant

de guérir les rhumatismes notamment la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. Cela s'explique par une variabilité des manifestations cliniques entre chaque patient. La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre les rhumatismes chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale.

Notre société de recherche contractuelle mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique. La présente saisine est donc une saisine générique qui a pour but d'évaluer de nouveaux composés créés et développés par nos clients pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse mais aussi la douleur.

Les différents composés, en comparaison à un produit de référence adapté, seront étudiés dans des modèles d'arthroses induites par injection intra-articulaire de composés chimiques (papaïne, mono-iodoacétate ou collagénase) générant une dégradation du cartilage. Les composés seront testés chez la souris et/ou le rat (selon le modèle), en traitement préventif ou curatif, et appliqués selon les schémas thérapeutiques inhérent aux composés, dans le cadre d'études menées au sein de la société. Selon notre historique, nous estimons mener 5 études par an, soit 25 études sur 5 ans. Sachant que 40 à 120 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 2400 souris et 600 rats seront utilisés sur 5 ans. Les molécules seront évaluées sur leur efficacité contre l'inflammation, la résorption osseuse, la dégradation cartilagineuse et/ou la douleur.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour :

Remplacer : la pathologie arthrosique étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pouvant reproduire cette complexité. Toutefois, nous demandons à nos clients de tester les principes actifs au préalable afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs.

Réduire : pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisé est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessairement réaliser une deuxième étude.

Raffiner : nous mettrons en place des mesures spécifiques et adaptées aux douleurs occasionnées par les rhumatismes pour éviter toute souffrance inutile et prolongée : les conditions d'hébergement seront optimisées (litière spécifique, augmentation de l'enrichissement, facilité d'accès à l'alimentation et ajout de nourriture appétente), nous utiliserons un anesthésique lors de l'induction de la pathologie, des traitements antalgiques pré et post induction et dès l'apparition des premiers signes inflammatoires. Un suivi quotidien des animaux sur des caractéristiques spécifiques (gonflement, locomotion et sensibilité mécanique) sera effectué. Tout animal ayant atteint un ou plusieurs des points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien et en s'appuyant sur des grilles de bien-être animal adaptées à chaque modèle) sera euthanasié.

13038 L'utilisation de modèles chroniques d'infarctus permet de mieux comprendre les mécanismes responsables des troubles du rythme chez les patients présentant un infarctus mais également d'explorer des solutions thérapeutiques conduisant à une meilleure prise en charge des patients souffrant de ces pathologies. L'objectif de ce projet consiste à créer des modèles animaux ayant des infarctus chroniques afin de pouvoir les utiliser par la suite dans des projets visant soit à comprendre les mécanismes électrophysiologiques et le remodelage structural liés à un infarctus, soit d'étudier des méthodes pour résoudre les phénomènes pathologiques associées.

De par leurs caractéristiques anatomiques et électrophysiologies cardiaques proche de ceux de l'homme, les espèces du porc et de l'ovine ont été identifiées comme les meilleurs modèles pour reproduire la pathologie étudiée. Ils permettront une application à l'homme des résultats obtenus dans ses différents projets. En fonction des altérations cardiaques recherchées (tissulaires, structurelles, physiologiques ou électrophysiologiques) et face à la diversité des mécanismes d'infarctus, différentes méthodes pourront être utilisées pour créer ces modèles selon la définition du projet dans lequel l'animal sera réaffecté après création de l'infarctus.

Pour répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, le REMPLACEMENT des animaux n'est actuellement pas

possible. En effet, l'étude des mécanismes physiologiques complexes dans leur globalité nécessite d'avoir recours à un modèle animal et il n'existe pas à ce jour de modèle de modélisation pour répondre aux objectifs.

Nous avons fixé une limite maximale 350 animaux au total sur 5 ans, soit en moyenne 70 animaux par an répartis sur 2 espèces (ovins et porcins) en fonction des besoins des études. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire en se basant sur notre expérience antérieure dans l'utilisation de ce modèle au cours de divers projets menés jusqu'à présent et au regard des projets à venir. Une attention sera portée à la REDUCTION du nombre de ces animaux utilisés dans les projets de réaffectation. Dans cet objectif de réduction, nous ferons également en sorte que chaque animal soit son propre contrôle dès que cela sera possible.

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

13039 La mémoire de travail est un type de mémoire qui nous permet de retenir et de manipuler une quantité limitée d'informations pendant un temps relativement court. Elle nous permet de stocker ces informations durant quelques secondes tout en exécutant d'autres tâches. Ce type de mémoire nous permet ainsi par exemple de prendre des notes écrites durant une présentation orale. La mémoire de travail joue un rôle important dans l'apprentissage, comme l'apprentissage d'une langue, et dans différents types d'activités comme la lecture et la résolution de problèmes. Ce type de mémoire implique différentes régions cérébrales qui interagissent entre elles. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un déficit de la communication entre ces régions cérébrales entraîne une détérioration de la mémoire de travail. L'étude de l'interaction entre ces différentes aires est donc importante pour comprendre son fonctionnement dans un cerveau sain mais également dans les pathologies associées. L'objectif de ce projet est de disséquer au niveau de la population de neurones comment les informations provenant de différentes aires cérébrales sont traitées.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives, l'étude de la communication entre différentes aires cérébrales nécessite l'utilisation d'un cerveau intact.

Réduire : ce projet utilisera 70 souris C57BL6/J durant 2 ans. Nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux tout en obtenant des statistiques solides.

Raffiner : nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies en administrant les molécules antalgiques les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie avec une surveillance quotidienne par du personnel compétent. Ils auront accès en permanence à l'eau et à de la nourriture de qualité constante, préparée spécifiquement pour leurs besoins physiologiques. Ils seront hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis avec des éléments qui leur permettront de reproduire leurs comportements naturels. Dans le cadre de leur suivi quotidien comme au cours des procédures, des points limites seront définis pour éviter ou limiter toute souffrance.

13040 Le glaucome est une maladie fréquente et grave des yeux. Il affecte plus de 70 millions de personnes dans le monde et fait perdre la vision de plus 8 millions de personnes chaque année. C'est la deuxième cause de cécité toutes causes confondues. Cette maladie est le résultat d'un

déséquilibre entre la production d'humeur aqueuse par le corps ciliaire et son élimination, causant une hyperpression intraoculaire et par la suite des lésions irréversibles de nerf optique. L'utilisation d'ultrasons de haute intensité (HIFU) est la dernière innovation en matière de traitement du glaucome, elle est utilisée en clinique en routine depuis quelques années. Elle vise à réduire la production d'humeur aqueuse par la destruction d'une partie de corps ciliaire de manière précise, rapide et non-invasive. Une des difficultés actuelles est d'évaluer le résultat immédiat : la lésion HIFU est trop petite pour des examens ophtalmologies classiques, et le résultat clinique ne peut se voir que plusieurs semaines après traitement.

Nous avons développé un nouveau concept qui va permettre une évaluation en temps réel des lésions HIFU sur le corps ciliaire. Après avoir réalisé la preuve de concept sur 2 lapins, il est nécessaire de réaliser des mesures supplémentaires pour obtenir des conclusions statistiques. Au préalable de cette preuve de concept, des tests *ex vivo* ont été réalisés sur des yeux d'animaux récupérés d'autres projets. Ce projet de recherche translationnelle comporte une procédure sans réveil. Le raffinement de celle-ci (utilisation des deux yeux, plusieurs mesures par œil) nous permettra de n'utiliser que 4 lapins pour s'assurer qu'il est bien possible d'évaluer l'effet immédiatement après le traitement. Selon la planification, il sera probable de réutiliser d'autres lapins (utilisés pour renouvellement de stock de tumeurs). La procédure de traitement couramment utilisée chez l'homme est indolore sous anesthésie locale ainsi que la procédure d'évaluation de l'effet (simple mesure physique non invasive). L'animal sera sous anesthésie générale et locale.

13041 Le but général est de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes approches thérapeutiques. Le travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, des modèles cellulaires ont dans un premier temps été utilisés pour étudier les gènes dérégulés et pour faire un criblage de plusieurs composés thérapeutiques afin de sélectionner le meilleur. Le but est maintenant d'utiliser des souris mimant la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie dans ce modèle vivant.

Il a été précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Ensuite, deux approches utilisant d'une part un croisement génétique dans le but de diminuer l'expression de dynamine 2 de 50% et d'autre part une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable aussi de diminuer le niveau de dynamine 2 ont été développées. Chez des souris malades présentant une myopathie et exprimant 50% de dynamine 2 ou injectées avec le composé, leur rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie ont été obtenus. Le but est maintenant d'appliquer cette approche thérapeutique à d'autres maladies musculaires (dystrophies) et de tester en parallèle une seconde approche thérapeutique, plus particulièrement pour la dystrophie musculaire de Duchenne.

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

Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement et de tester des thérapies. Ces effets ne peuvent être observés que sur un organisme vivant, c'est pourquoi nous utiliserons des souris. Aucune autre alternative expérimentale n'existe. Les souris seront analysées *in vivo* et *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales seront réalisées chez les mêmes souris (maximum 2 par jour avec un temps de repos adéquat), pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité

scientifique de l'étude. Ainsi, un maximum de 284 souris sera utilisé. Les souris seront surveillées quotidiennement pour détecter précocément tout signe de douleur ou souffrance. Afin d'améliorer le bien-être animal tout au long de la vie de l'animal, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (ajout de matériel pour faire un nid), le regroupement des animaux de même sexe pour limiter l'isolement et favoriser le comportement social. Lors de l'expérimentation, tout signe d'inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance à l'animal. Pour les procédures expérimentales invasives, plusieurs mesures seront prises pour maintenir le bien-être animal comme le recours à l'anesthésie et l'analgésie et l'utilisation d'un tapis chauffant afin de maintenir la température corporelle des animaux si la procédure expérimentale implique une anesthésie. Toujours en cas d'anesthésie, les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet puis suivis ensuite quotidiennement via une fiche scoring pour définir les points limites permettant de limiter la souffrance, douleur, stress (RAFFINEMENT).

13042 Les médicaments anti-plaquettaires sont utilisés dans le traitement de la thrombose artérielle. Ils ont permis de réduire considérablement la survenue d'accidents cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, mais leur utilisation augmente le risque de saignement. Nous avons développé un agent dirigé contre un récepteur des plaquettes qui inhibe la thrombose chez la souris et le singe sans entraîner de risque hémorragique. Cet agent a été bien toléré chez l'homme et fera bientôt l'objet d'une étude clinique chez des patients présentant un accident vasculaire cérébral. Une autre étude clinique visera à utiliser cet agent anti-plaquettaire en combinaison avec d'autres médicaments anti-thrombotiques. A ce jour, on ne sait pas si cette association augmente le risque de saignement et cette information est essentielle pour permettre la validation de l'essai clinique chez les patients.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'agent anti-plaquettaire que l'on a développé en combinaison avec 2 autres anti-thrombotiques dans un modèle de mesure du temps de saignement chez la souris C57B6 qui exprime un récepteur plaquettaire (GPVI) humanisé.

Réduction. Le modèle d'évaluation du temps de saignement est très bien maîtrisé au laboratoire, déjà décrit et publié. Ceci permet d'éviter toute mise au point utilisant des animaux supplémentaires. De plus, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe sera le plus petit possible, soit 8, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ces choix permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Raffinement. Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement
- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
- Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire pendant chaque procédure.
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de la procédure afin lutter contre l'hypothermie

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. Si les points limites définis dans cette saisine sont atteints, les procédures expérimentales seront interrompues afin de réduire la souffrance induite à l'animale.

Remplacement. Il est impossible de reproduire le saignement *in vitro* en raison de sa complexité. En effet le risque hémorragique dépend des interactions entre les vaisseaux et la composition du sang. Cet examen ne peut donc pas être réalisé de manière satisfaisante *in vitro*. En conséquence, nous proposons d'utiliser un modèle de temps de saignement chez la souris

Nous utiliserons 80 souris pour mener à bien ce projet.

13043 Des données de plus en plus nombreuses indiquent que nombre de protéines impliquées dans le développement tumoral sont également des régulateurs importants du métabolisme. Notre projet vise à comprendre les fonctions métaboliques de 3 acteurs importants de la tumorigenèse qui agissent au sein de la même cascade moléculaire: le suppresseur de tumeurs p53, l'oncogène MDM2 et la protéine multifonctionnelle E4F1. Nos données obtenues sur des cellules en culture ainsi que celles de la littérature montrent que ces 3 protéines sont des régulateurs importants du métabolisme lipidique. Notre objectif est maintenant d'évaluer les rôles respectifs de ces 3 acteurs dans le métabolisme des adipocytes et d'en évaluer l'inter-dépendance dans le contexte d'un organisme entier. Pour répondre à cette question, nous utiliserons différents modèles murins génétiquement modifiés afin d'évaluer les conséquences de l'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes dans les adipocytes. Nous évaluerons à la fois les effets directs de l'inactivation de ces gènes dans les adipocytes sur le fonctionnement du tissu adipeux mais également les conséquences métaboliques indirectes sur d'autres tissus tels que le foie, le muscle, ou le pancréas. Les tests métaboliques réalisés sur ces groupes expérimentaux seront réalisés dans le respect strict de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu d'utiliser un nombre minimum mais suffisant d'animaux pour garantir la puissance statistique de nos résultats expérimentaux. Par ailleurs, chacun de ces animaux sera analysé du point de vue métabolique de la façon la plus exhaustive possible (plusieurs tests métaboliques seront réalisés sur chaque animal afin d'en limiter le nombre).

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "endpoints"): le bien-être de nos animaux est suivi de façon quotidienne et nos animaux seront élevés dans un milieu enrichi (litière mélangée à des copeaux et briques de peuplier). Une attention particulière sera portée aux animaux qui seront prédisposés au développement tumoral du fait de la manipulation génétique subie.

- « Remplacer » les modèles animaux : Il n'existe à ce jour aucun modèle d'étude *in vitro* permettant de modéliser la complexité des interactions métaboliques à distance entre tissus. De fait, cette étude doit obligatoirement être réalisée *in vivo* chez l'animal.

Pour l'ensemble de ce projet nous avons prévu un nombre total de 320 souris réparties sur 32 groupes expérimentaux distincts qui seront analysés sur une durée de 5 ans. Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance journalière et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

13044 La chirurgie demeure à l'heure actuelle le seul traitement à visée curative pour de nombreux cancers. Cependant, afin d'en améliorer les résultats ou de permettre à plus de patients d'en bénéficier, il est souvent nécessaire de prévoir un traitement adjuvant au geste chirurgical. Ainsi, les thérapies multimodales, ainsi que le développement de nouvelles technologies (radiofréquence, cryothérapie, HIFU...) et techniques (chirurgie en 2 temps, ...) associées à la chirurgie se sont largement développées aux cours des dernières années. Il y a donc une nécessité urgente à disposer de modèles précliniques adaptés afin de pouvoir valider ces nouveaux traitements avant de les proposer aux patients. En effet, il est crucial de pouvoir ajuster au mieux les différentes phases du traitement afin de maximiser leur effet cumulatif tout en réduisant les éventuels effets adversaires.

Ces traitements incluant une phase chirurgicale, les modèles tumoraux rongeurs couramment utilisés ne sont pas du tout adaptés et il faut se tourner vers des espèces dont la taille, l'anatomie et la physiologie sont plus adaptées à l'évaluation de ces traitements. Parmi les animaux de taille moyenne compatible avec un geste chirurgical comparable à ceux effectué chez l'Homme, le lapin est le seul modèle animal pour lequel un modèle tumoral est disponible et parfaitement maîtrisé : le VX2. Il s'agit donc d'un modèle majeur pour la recherche translationnelle chirurgicale. Ce modèle, principalement disponible sous forme de fragments tumoraux à greffer dans l'organe cible de l'animal, nécessite d'être entretenu et amplifié régulièrement afin de disposer du matériel tumoral

fonctionnel nécessaire pour réaliser les différentes études d'efficacité des traitements novateurs envisagés.

Les fragments conservés sous forme congelée doivent donc être greffés régulièrement sur des animaux afin de vérifier leur pouvoir tumorigène et de générer les quantités de tumeurs nécessaires pour les études d'efficacité.

Pour chaque passage *in vivo*, il est prévu d'utiliser 2 lapins afin de minimiser le nombre d'animaux tout en palliant un éventuel défaut de croissance tumorale (événement rare). La greffe sera également testée par une voie moins invasive et permettant un suivi plus simple, la voie sous-cutanée.

La procédure d'implantation chirurgicale est parfaitement maîtrisée par l'équipe et la connaissance du modèle permet de mettre en place des points limites précoces minimisant ainsi la souffrance potentielle.

Un maximum de 6 passages *in vivo* par an en fonction des besoins des autres projets est envisagé, soit un total maximal de 60 lapins sur 5 ans pour ce projet de recherche translationnelle.

13045 La pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin représentent la première cause de prématurité de morbi-mortalité néonatale induite en Europe. L'Organisation Mondiale de la Santé estime à 50 000 décès maternels annuels directement dus à la prééclampsie. Ces pathologies spécifiques de la grossesse sont dues à une dysfonction précoce du développement placentaire. Il n'existe à ce jour aucune thérapeutique curative. D'importants progrès ont cependant été réalisés dans la compréhension de la physiopathologie de ces maladies : une rupture de la balance angiogénique circulante, secondaire à la dysfonction placentaire est responsable de la symptomatologie maternelle. De nombreuses équipes de recherche tentent de comprendre les mécanismes placentaires qui aboutissent à un excès de libération de molécule anti-angiogéniques (sFlt-1, sEng) et à une baisse de molécules pro-angiogéniques (PlGF).

Nos résultats préliminaires, *in vitro*, sur des cultures cellulaires primaires de trophoblaste humain, montrent un lien entre la régulation de la différenciation du trophoblaste par stimulation des voies AMPcyclique / protéine kinase A dépendantes et la modulation de la fonction angiogénique placentaire.

Cette première série d'expérimentation animale consiste à vérifier si ces résultats se confirment *in vivo* avec des molécules déjà utilisées chez la souris pour stimuler les voies AMPcyclique / protéine kinase A dans d'autres organes. Nous souhaitons, avant de lancer un projet plus vaste, établir que l'injection intra péritonéale d'activateur des adénylates cyclases (forskoline hydrosoluble) ou d'inhibiteurs des phosphodiesterases (pentoxifylline) impacte la fonction angiogénique placentaire (balance sFlt-1/PlGF circulante) en cours de gestation. Cette étude préliminaire nous orientera sur les doses, les durées d'injection et le degré de réponse placentaire afin de mettre en place secondairement un protocole incluant également des souris knock-out pour une des sous-unités de la protéine kinase A ainsi que des souris en restriction vasculaire placentaire. Pour ce projet nous envisageons d'utiliser un maximum de 30 souris sauvages sur 3 mois.

Toutes les mesures ont été prises afin de diminuer le nombre d'animaux gestants pour cette étude pilote, à la fois en optimisant le nombre de groupes expérimentaux (n=5) mais également en ajustant le nombre d'animaux par groupe (n=6). Les agents pharmacologiques ont été choisis pour leur action pharmacodynamique mais également pour leur solvant respectif unique afin de réduire au maximum les animaux contrôles (groupe véhicule unique). Des mesures seront systématiquement prises pour diminuer la douleur et l'angoisse animale. Tous les prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie générale, une prémédication par kétomine et xylazine sera systématiquement prescrite préalablement à la laparotomie, le jour de l'euthanasie.

13046 Cette étude porte sur un protocole chirurgical permettant d'effectuer un allongement osseux. Cette procédure est appelée chirurgie de callotasis et permet la création d'os afin de venir corriger la différence de taille entre deux membres. Ce type de problème peut survenir chez des enfants qui ont eu un problème au niveau de leur cartilage de croissance, dans des cas de pathologie (nanisme)

ou encore dû à des retraits de tumeur osseuse. Le principe est de faire une fracture nette sur l'os que l'on souhaite allonger, cette induction de fracture est appelée ostéotomie. Ensuite afin de maintenir les segments osseux bien alignés, le chirurgien va venir installer un fixateur externe. Ce dispositif médical sera maintenu en place tout au long du protocole d'allongement osseux. À la suite de cela, on va attendre naturellement que les premières étapes de la régénération se fassent, c'est-à-dire qu'on attend l'apparition d'un hématome qui est riche en tissus fibreux et en cellules permettant la réparation future de l'os. Cette dernière s'appelle la phase de latence. Ensuite on enchaîne avec la phase de distraction active, car comme elle le sous-entend durant cette période on va venir activer le fixateur. Autrement dit on va venir actionner le fixateur pour éloigner les segments osseux l'un par rapport à l'autre. On va venir effectuer cet éloignement très lentement afin de ne pas déchirer le nouveau tissu créé au sein de la fracture. Grâce aux données empiriques on sait qu'il faut activer le fixateur de manière à allonger d'1 mm par jour et ceci fait en 4 fois (donc 4x0.25mm) chez l'homme. Une fois l'allongement souhaité obtenu, la phase de consolidation commence. On laisse le fixateur en place mais on le bloque dans l'optique de laisser les cellules du corps faire la réparation de l'os. Et cela prend du temps il faut s'imaginer que pour 1mm d'allongement il faut attendre 1 mois pour que le corps humain arrive à le réparer. Et pour finir on retire le fixateur. L'inconvénient de ce protocole est qu'il y a beaucoup de complications que l'on peut voir apparaître en cours de route comme des infections, des douleurs, des problèmes vasculaires, articulaires ou nerveux. En effet lors de l'allongement il faut penser que l'on vient également allonger tous les tissus environnants. Dans notre étude nous nous sommes focalisés sur la consolidation de l'os au cours de la dernière phase du protocole. Dans cette phase le corps humain va minéraliser les tissus nouvellement créés. Il va permettre à l'os de reprendre une de ses fonctions principales qui est le support du poids du corps. Or dans 3 à 50% des cas après le retrait du fixateur on constate soit une fracture soit une déformation de l'os. Et ces symptômes apparaissent soit directement après le retrait alors que le patient n'a pas appuyé sur son membre ou dans le mois suivant le retrait. C'est pourquoi nous avons mis en place un modèle animal pour l'allongement osseux. Nous sommes obligés de passer par un modèle dit *in vivo* et non *in vitro* car l'environnement biologique complexe et mécanique ne peut être recréé par cette méthode. Après une recherche poussée de la littérature, nous avons constaté qu'aucun modèle n'allait jusqu'à la consolidation complète de l'os, c'est-à-dire jusqu'au retrait du fixateur et la mise en marche sans fixateur de l'animal. De ce fait nous avons créé un dispositif d'allongement pour le rat (basé sur son anatomie) et souhaitons venir stimuler la réparation de l'os grâce à l'utilisation de facteur de croissance qui viendraient stimuler et proliférer les cellules permettant la réparation du tissu osseux. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R » sera appliquée. Ainsi, le plus faible nombre d'animaux possible sera inclus pour avoir des résultats statistiquement exploitables. Ce projet nécessitera au maximum de 45 rats de souche Sprague Dawley répartis en 3 groupes : 1 groupe de 20 animaux traités avec le facteur de croissance et 1 groupe de 20 animaux sans facteur de croissance, et un groupe composé de 5 animaux qui permettra de tester les effets de la chirurgie (ostéotomie + pose du fixateur).

De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquence. En amont de la chirurgie les animaux recevront une injection d'analgésiant 20 minutes avant l'intervention chirurgicale. Pendant la chirurgie, les yeux de l'animal seront protégés de la sécheresse. Durant toute l'opération l'animal est mis sur une couverture chauffante. Enfin, il sera positionné sous une lumière rouge le temps du réveil. Ce protocole est invasif donc pour permettre le bien-être de nos animaux une constante surveillance sera faite tout au long du protocole afin de minimiser les sensations de douleur et d'inconfort. Des injections d'analgésique sur une durée de trois jours après la chirurgie seront effectuées. Pendant la suite du protocole cela n'est pas nécessaire sauf si l'animal montre des signes d'inconfort ou de mal-être et donc les douleurs seront prises en charge grâce à l'ajout d'analgésiant. En revanche, la présence d'analgésique dans le biberon sera présente durant la phase de distraction active. Dans le cas où la douleur sera trop importante ou que nous soyons dans l'incapacité de résoudre la raison du mal-être, l'animal devra être mis à mort. Ils auront à disposition nourriture et eau, le cycle jour nuit sera respecté et la température ambiante sera de

22°C. Pour finir une petite balle en plastique pourra être mise dans la cage afin qu'ils puissent se divertir le temps où nous ne sommes pas présents.

13047 L'aldostérone et le récepteur minéralocorticoïde (MR) jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'équilibre de l'eau et du sel dans l'organisme. Chez la souris, nous avons démontré que l'expression du MR augmente au 18^e jour de développement (E18), puis diminue à la naissance (J0) avant de remonter après la naissance (J7). Cette augmentation de l'expression du MR après la naissance est primordiale pour maintenir l'équilibre de l'eau et du sel chez le bébé et lui permettre de grossir. Les nouveau-nés humains, nés avec un retard de croissance intra-utérin (RCIU) ou nés prématurés, n'arrivent pas à prendre de poids en l'absence d'apports de sel et d'eau très importants par voie intra-veineuse. Une expression anormalement basse de l'expression du MR après la naissance pourrait alors expliquer la déshydratation observée après la naissance associée aux pertes d'eau et de sel. Notre projet vise à comprendre les mécanismes qui régulent l'expression du MR en période périnatale afin de mieux prendre en charge ces nouveau-nés très fragiles.

Dans cet objectif, nous utiliserons deux modèles de souris car l'expérimentation est impossible chez des nouveau-nés humains : 1) un modèle de souris avec RCIU obtenu après administration d'hormone glucocorticoïde (Dexaméthasone ou DEX) 2) un modèle de souris prématurés obtenu après injection de lipopolysaccharides (LPS).

Les souris seront hébergées dans des conditions d'élevage enrichies de façon à améliorer leur bien-être. Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et de réduire en particulier le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le nombre d'expériences et de souris nécessaires. Le nombre d'animaux utilisés sera de 96 souris femelles afin d'obtenir le nombre de souriceaux nécessaires pour une puissance statistique suffisante pour la comparaison des différents groupes et conditions. Le remplacement n'est pas possible car il n'existe pas de modèle de cellules possédant les propriétés d'un nouveau-né prématuré ou avec un RCIU. Une surveillance journalière sera assurée après administration de la DEX ou de LPS. Des points limites sont établis et entraîneront le sacrifice anticipé de l'animal si nécessaire.

Les résultats de cette étude auront un impact majeur dans la compréhension des pertes sodées chez les nouveau-nés prématurés ou avec un RCIU, qui représentent 1% des naissances en France, soit 120 000 naissances par an, et permettront d'améliorer leur prise en charge dans un objectif de médecine personnalisée.

13048 La mémoire de travail est un type de mémoire qui nous permet de retenir et de manipuler une quantité limitée d'informations pendant un temps relativement court. Elle nous permet de stocker ces informations durant quelques secondes tout en exécutant d'autres tâches. Ce type de mémoire nous permet ainsi par exemple de prendre des notes écrites durant une présentation orale. La mémoire de travail joue un rôle important dans l'apprentissage, comme l'apprentissage d'une langue, et dans différents types d'activités comme la lecture et la résolution de problèmes. Ce type de mémoire implique différentes régions cérébrales qui interagissent entre elles. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, un déficit de la communication entre ces régions cérébrales entraîne une détérioration de la mémoire de travail. L'étude de l'interaction entre ces différentes aires est donc importante pour comprendre son fonctionnement dans un cerveau sain mais également dans les pathologies associées. L'objectif de ce projet est de disséquer au niveau de la population de neurones comment les informations provenant de différentes aires cérébrales sont traitées.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives, l'étude de la communication entre différentes aires cérébrales nécessite l'utilisation d'un cerveau intact.

Réduire : ce projet utilisera 70 souris C57BL6/J durant 2 ans. Nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux tout en obtenant des statistiques solides.

Raffiner : nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies en administrant les molécules antalgiques les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur vie avec une surveillance quotidienne par du personnel compétent. Ils auront accès en permanence à l'eau et à de la nourriture de qualité constante, préparée spécifiquement pour leurs besoins physiologiques. Ils seront hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis avec des éléments qui leur permettront de reproduire leurs comportements naturels. Dans le cadre de leur suivi quotidien comme au cours des procédures, des points limites seront définis pour éviter ou limiter toute souffrance.

13049 Le but général est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes approches thérapeutiques. Le travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, des modèles cellulaires ont dans un premier temps été utilisés. Il est maintenant prévu d'utiliser des souris mimant la dystrophie myotonique de type 1 pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie dans ce modèle vivant.

Il a été montré précédemment qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Deux approches utilisant d'une part un croisement génétique dans le but de diminuer l'expression de dynamine 2 de 50% et d'autre part une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable aussi de diminuer le niveau de dynamine 2 ont été utilisées. Chez des souris malades exprimant 50% de dynamine 2 ou injectées avec le composé, le rétablissement quasitotal sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie a été obtenu ainsi que l'allongement de leur durée de vie. Le but est maintenant d'appliquer cette approche thérapeutique par croisement génétique à d'autres maladies musculaires (dystrophies), plus particulièrement à la dystrophie myotonique de type 1, comme preuve de concept.

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est la forme la plus commune de dystrophie musculaire chez les adultes, avec une incidence de 1 :15000, se caractérisant notamment par une atteinte musculaire sévère et progressive, des défauts cardiaques et des déficits cognitifs. A ce jour, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, de mieux comprendre leur développement et de tester des thérapies. Ces effets ne peuvent être observés que sur un organisme vivant, c'est pourquoi nous utiliserons des souris. Aucune autre alternative n'existe (REPLACEMENT). Les souris seront analysées *in vivo* et *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures. Plusieurs procédures expérimentales (maximum deux par jour avec un temps de repos adéquat) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 8 à 13 souris/groupe (selon les génotypes obtenus) seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Ainsi, un maximum de 43 souris sera utilisé. Une surveillance quotidienne permettra de repérer précocement les signes de souffrance/douleur/stress. Afin d'améliorer le bien être animal tout au long de la vie de l'animal, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (ajout de matériel pour faire un nid, bâtons à ronger), le regroupement des animaux de même sexe pour limiter l'isolement et favoriser le comportement social. De la nourriture adaptée à ce modèle de souris sera utilisée. Lors de l'expérimentation, tout signe d'inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance à l'animal. Pour les procédures expérimentales invasives, plusieurs mesures seront prises pour maintenir le bien être animal comme le recours à l'anesthésie et l'utilisation d'un tapis chauffant afin de maintenir la température corporelle des animaux si la procédure expérimentale implique une anesthésie. Toujours en cas d'anesthésie, les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet puis suivis ensuite quotidiennement via une fiche scoring pour définir les points limites permettant de limiter la souffrance, la douleur et le stress (RAFFINEMENT).

13050 Les Entérovirus à tropisme cardiaque, particulièrement les virus Coxsackie B3, sont considérés comme une cause majeure de myocardites virales humaines. Ils sont fréquemment impliqués dans les myocardites aiguës, maladie inflammatoire du myocarde, qui évolue dans 10% des cas en cardiomyopathies dilatées (CMD), seconde cause de transplantation cardiaque dans le monde et également responsable de cas de mort subite cardiaque. À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique de la CMD et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'évolution de la myocardite aiguë en CMD restent à explorer.

L'objectif de ce projet d'étude est d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes viraux impliqués dans la persistance virale et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour guérir de la myocardite virale aiguë et empêcher sa progression vers une myocardite chronique ou vers le stade clinique de CMD.

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

Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats satisfaisants, statistiquement significatifs. Afin de limiter la douleur durant toute la durée des procédures, les souris seront surveillées et pesées chaque jour, y compris les weekends et les jours fériés, une grille d'évaluation de l'état des animaux sera établie et au premier signe de douleurs les souris seront euthanasiées immédiatement. Aussi, afin de limiter et de prévenir toute souffrance et l'angoisse des animaux, nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimatation de 7 jours après leur arrivés en zone d'hébergement, d'enrichissement des cages notamment avec du coton. Les expériences seront réalisées par le même expérimentateur du début à la fin de la procédure.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet est : 135 sur 4 ans

13051 Il existe une réponse immunitaire innée dans le système nerveux central. Cette réponse s'amorce à partir des structures non protégées par la barrière hémato-encéphalique et du réseau micro vasculaire cérébral et s'étend progressivement à l'ensemble du cerveau au cours d'une infection systémique. L'activité transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines de la réponse immunitaire innée est aussi fortement stimulée lors de différentes perturbations neurologiques. Cette découverte récente a soulevé l'hypothèse selon laquelle l'inflammation pourrait contribuer à la neurodégénérescence et à la démyélinisation. Les molécules immunitaires peuvent également stimuler la libération des facteurs neurotrophiques et, par conséquent, promouvoir la réparation et la re myélinisation des neurones. Ainsi, la réponse innée inflammatoire cérébrale peut, d'une part, protéger les neurones mais, d'autre part, être une cause directe de certaines maladies neurodégénératives. Dans ce contexte, ce présent projet vise à bloquer l'expression de gènes du système immunitaire stimulé par l'injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS), grâce à une injection intraventriculaire d'un oligonucléotide antisens chez la souris néonatale de 20 jours.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de l'injection intraventriculaire chez la souris néonatale de 20 jours d'un oligonucléotide antisens afin de prévenir une réaction immune induite par l'injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS) nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes *in vivo* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connections neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est de 15 souris par groupe, soit un total de 45 souris pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées:

A leur arrivée, les femelles gestantes sont mises en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les femelles gestantes bénéficient d'une période d'acclimatation (7 jours), et sont chacune placées dans de grandes cages (425x266x155mm, soit 820cm²) qui permettront de les accueillir avec leurs souriceaux. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser et bénéficient également d'un enrichissement par nid végétal.

Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale. Un traitement antalgique est systématique ; il est administré avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux pour prévenir toute douleur. Les souriceaux sont hébergés avec les mères pour toute la durée de l'étude c'est-à-dire jusqu'à P25.

Pour limiter les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons défini des critères d'observation qui permettent d'évaluer l'état de santé et le bien-être des souris. Si les points limites que nous avons fixés sont atteints, l'expérience est immédiatement interrompue et l'animal concerné est euthanasié. Cette évaluation est réalisée quotidiennement. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

13052 L'objectif de projet consiste à mesurer la valeur nutritionnelle des matières premières (céréales, co-produits, graines, tourteaux, huiles, ...), qui entrent dans la composition des aliments pour volaille. Pour bien formuler les aliments, les nutritionnistes utilisent des tables d'alimentation, des matrices qui caractérisent les matières premières utilisées.

Il est indispensable de mettre à jour régulièrement cette matrice car elle doit prendre en compte les variabilités annuelles des matières premières, les nouvelles origines, les nouveaux co-produits. Si ce travail n'est pas réalisé, la table d'alimentation sera vite périmée, la formulation sera mal réalisée et l'aliment sera mal valorisé par l'animal : il faudra plus d'aliment pour le nourrir, les rejets (azote, phosphore...) dans les fientes seront donc plus importants, ce qui augmente l'impact environnemental sur la planète. L'animal peut même être malade car il digère mal ce qu'on lui donne à manger à cause d'une mauvaise formulation de l'aliment. Cette caractérisation des matières premières est donc indispensable. Or, les évaluations de ces matières premières à partir d'analyses chimiques restent problématiques et les techniques *in vitro* utilisant des préparations enzymatiques sont encore délicates à mettre en œuvre. De plus, elles demeurent imprécises quand on cumule l'incertitude des modèles de prédiction à celle associée à la variabilité analytique. Ainsi le seul recours est la mesure *in vivo*. Pour ce faire, nous élevons 42 coqs chaque année (sur 5 ans donc 210 coqs pour le projet) pour réaliser nos essais de digestibilité en appliquant la méthode de référence européenne.

Concrètement, nous contrôlons l'ingéré alimentaire (pesée de l'aliment distribué, du refus), nous récupérons l'excrété (les fientes) et par différence, nous calculons les nutriments absorbés par l'animal. Pour que ces mesures soient fiables et précises, les coqs sont élevés dans des modules individuels équipés de plateaux de récupération de fiente en-dessous. Un perchoir enrichit le milieu. L'ambiance de la salle d'élevage est maîtrisée (chauffage, ventilation). Le protocole prévoit une période d'adaptation avant de commencer les mesures. De plus, avant chaque début de procédure expérimentale, les points limites sont vérifiés: comportement, boiterie et emplumement. En fonction de cette notation, l'animal peut être mis hors essai pour être soigné.

Comme indiqué dans la méthode normalisée, les coqs ont un accès libre permanent à l'eau de boisson et nous réalisons une mise à jeûn de 24h pour vider le tube digestif entre chaque matière première et éviter ainsi les biais entre mesure. En dehors de cette mise à jeûn temporaire, les coqs sont nourris ad libitum. Nous observons que les coqs maintiennent leur poids et leur état corporal au fil du temps.

Un essai dure 1 semaine. Une vingtaine d'essais sont menés chaque année avec 42 coqs. Un même coq est utilisé pendant 1 an avant d'être réformé pour atteinte de la limite d'âge.

13053 Le myélome multiple (MM) est un cancer qui touche un type de cellules hématopoïétiques appelées plasmocytes. Dans cette pathologie, les plasmocytes tumoraux s'accumulent dans la moelle osseuse et entraînent des signes cliniques caractéristiques : fracture des os, insuffisance rénale, anémie. Malgré des avancées importantes dans les traitements ces dernières années, la maladie reste incurable et de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être proposées et testées dans des modèles pré-cliniques.

Parmi les molécules récemment proposées et efficaces, on trouve le bortezomib, un inhibiteur du protéasome (IP), qui entraîne la mort des cellules de MM en inhibant un des systèmes de dégradation des protéines cellulaires. Cet IP de première génération ainsi que les IP plus récents entraînent dans un premier temps une bonne réponse mais malheureusement, dans une grande majorité de cas, les cellules tumorales mettent en place des mécanismes de résistance. Ces IP montrent aussi une certaine toxicité. La combinaison de ces inhibiteurs avec des molécules ciblant d'autres voies de signalisation semble être une stratégie incontournable dans le MM comme cela est décrit pour l'ensemble des cancers. Les IP entraînent la mort cellulaire dite apoptose en générant des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS). Notre hypothèse de travail a été de proposer qu'augmenter encore la production de ROS dans les cellules de MM pourrait contourner les mécanismes de résistance et rétablir une certaine sensibilité.

Plusieurs modèles cellulaires nous ont permis de démontrer, *in vitro*, que la mort des cellules de MM induite par les PI peut être potentialisée par l'auranofin, un sel d'or, qui a la propriété d'inhiber une enzyme antioxydante, la thioredoxine reductase. L'auranofin est une molécule déjà utilisée en clinique dans la polyarthrite rhumatoïde. L'auranofin est capable d'effets synergiques avec le bortezomib et d'entraîner l'apoptose des cellules de MM *in vitro*. Ces mêmes expériences doivent être reproduites *in vivo* dans des modèles de xénogreffe chez la souris immunodéprimée. C'est cette partie du projet qui est présentée dans ce formulaire. Nous avons déjà utilisé par le passé des modèles murins de MM (souris immunodéprimées, greffe des cellules tumorales par injection i. v., suivi des tumeurs par imagerie) et montré que ces modèles reproduisent fidèlement la pathologie humaine. Notre étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous.

Remplacement : La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine du cancer. Le modèle *in vivo* de greffe de cellules tumorales dans des souris immunodéprimées est indispensable afin de pouvoir vérifier les effets obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires et des cellules primaires de patients. Dans ce contexte, ce modèle n'est pas remplaçable.

Réduction : Nous consultons un biostatisticien avant de procéder à de telles études pour s'assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. En l'occurrence, nous constituerons des groupes de six animaux pour chacun des traitements qui seront administrés et pour chacune des lignées greffées. Au total, le nombre d'animaux qui seront utilisés sera de 48. Deux lignées cellulaires testées seront testées *in vivo* : avec 4 types d'injection : contrôle, auranofin, bortezomib et combinaison des deux drogues. Les concentrations utiles des drogues sont connues. Nous utiliserons six animaux par lot soit au final $2 \times 4 \times 6 = 48$ souris.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à l'injection s. c. des cellules tumorales. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés de la naissance à la mort de l'animal. De plus, les procédures considérées dans ce projet prévoient l'utilisation d'une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie adéquate.

13054 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales,

pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Les femmes sont donc plus touchées par cette pathologie que les hommes, et leur susceptibilité à la migraine varie en fonction de leur cycle menstruel ou des modifications hormonales qu'elles peuvent rencontrer au cours de leur vie (puberté, ménopause, grossesses). Par ailleurs, ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessitent donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

Parmi les régions cérébrales qui sont impliquées dans la migraine, nous nous intéressons à une région noradrénergique, le locus coeruleus (LC) située dans le tronc cérébral dont l'activité est modifiée dans un modèle murin de migraine et qui pourrait être importante dans la genèse des crises de migraine. Cette région est richement connectée et son dysfonctionnement pourrait altérer les réponses des nombreuses aires cérébrales. Cependant l'anatomie de ce réseau n'est pas parfaitement connue, nous avons pour objectif de mieux le caractériser. Pour mieux connaître le fonctionnement de cette région noradrénergique, nous voulons également enregistrer les neurones qui la composent et qui spécifiquement projettent vers le complexe sensitif du trijumeau qui est le premier relais des informations sensitives issues de la face et des méninges. Nous allons donc injecter des traceurs ou virus antérogrades et/ou rétrogrades dans le LC ainsi que dans le Sp5C, la moelle épinière et/ou l'amygdale qui sont des régions interconnectées afin de mieux comprendre l'organisation de ces différents partenaires. Toute la problématique est de déterminer quels sont les meilleurs traceurs permettant de garder le plus longtemps possible les neurones en vie et obtenir le meilleur marquage pour ensuite limiter le nombre d'expériences réalisées.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum. Dans ce but, les animaux sont placés dans des cages enrichies (rouleaux permettant de se cacher) ce qui permet de réduire le stress des animaux. Les animaux auront accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. D'après les études précédentes, la chirurgie nécessaire pour l'injection des traceurs est bien supportée par les animaux. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment, sont une douleur modérée. Par ailleurs, la chirurgie est effectuée sous anesthésie générale (chloral hydrate, 400 mg/kg), les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant tout le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le temps de chirurgie est optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. Les animaux seront ensuite observés tous les jours par l'expérimentateur. Ils seront pesés tous les 2 jours, leur vitalité sera vérifiée (déplacement, alimentation, état général, comportement douloureux). Un traitement au ketoprofène pendant 3 jours (5mg/kg en sous-cutané) puis au paracétamol (30mg/kg en sous-cutané) pendant 2 jours, sera administré. Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux chez qui l'injection ne fonctionnerait pas (site mal placé, problème de migration du traceur. Nous évaluons à 80 animaux, le nombre nécessaire pour réaliser cette étude.

13055 L'infarctus du myocarde résulte de l'obstruction d'une artère coronaire suite au détachement d'une plaque d'athérome et/ou la formation d'un caillot qui empêche la perfusion normale du muscle cardiaque. Ce dernier ayant un besoin constant d'apport en sang oxygéné pour fonctionner, l'infarctus a souvent des conséquences sévères sur le cœur, impliquant une destruction plus ou moins importante de tissu cardiaque. A la suite de cette lésion, si le patient a survécu, un processus de cicatrisation impliquant l'invasion de cellules inflammatoires et la formation d'une cicatrice fibreuse remplace le tissu lésé car les cardiomyocytes ne peuvent pas se régénérer de façon significative. Cette cicatrice qui se forme dans les premiers jours après l'infarctus est non contractile et induit une surcharge de travail pour le reste du muscle cardiaque. Il en résulte un processus appelé "remodelage cardiaque" qui prend place dans les semaines qui suivent, altérant la forme du cœur et ses capacités à se contracter et se relaxer et peut conduire à une insuffisance cardiaque. Il est important d'agir dès que possible sur la survie du tissu myocardique après un infarctus par

des approches chirurgicales et pharmacologiques. Notre objectif est de tester le potentiel thérapeutique d'une administration d'une vitamine B3 après un infarctus dans le but d'améliorer la survie et la fonction cardiaque. Nous avons déjà prouvé les effets bénéfiques de ce traitement sur d'autres pathologies cardiaques conduisant également à l'insuffisance cardiaque. Ce traitement peut agir directement sur le cœur mais aussi sur d'autres organes dont la fonction peut être altérée par un dysfonctionnement du cœur, notamment les reins, les muscles squelettiques et les poumons. Nos premières analyses ont été réalisées sur des cultures de cellules cardiaques. Cependant afin de montrer l'utilité thérapeutique de cette vitamine, il est impératif de travailler dans un modèle animal intégrant tous les paramètres de régulation de la fonction cardiaque qui ne peuvent être simulés *in vitro*. Nous simulerons donc chez la souris un infarctus du myocarde par ligature chirurgicale d'une artère coronaire et testerons les effets du traitement sur la survie et la fonction cardiaque. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) : (i) une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet, (ii) les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux, (iii) l'insuffisance cardiaque est induite en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques, (iv) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés, (v) certaines expériences complémentaires seront réalisées sur des cultures primaires. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Un total de 96 souris seront nécessaires pour le projet.

13056 Le traitement des douleurs chroniques est un enjeu de santé publique important. Certaines formes d'inflammation chronique ou d'atteintes des nerfs périphériques (neuropathies) provoquent chez les patients des douleurs chroniques impossibles aujourd'hui à soulager. Nous recherchons dans ce cadre de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient permettre de développer de nouveaux médicaments capables de soulager les patients atteints de douleurs chroniques. Une protéine réceptrice (P2X4) est très exprimée en conditions inflammatoires et neuropathiques à la surface de plusieurs types de cellules impliqués dans la transmission de la douleur. Cette protéine semble jouer un rôle clé dans ces processus de douleurs chroniques. Le but de ce projet est de comprendre le rôle de P2X4 et le(s) types cellulaires impliqués dans la mise en place et le maintien des douleurs chronique inflammatoires et neuropathiques qui pourrait déboucher sur de nouveaux traitements de la douleur ciblant ce récepteur.

Pour cela, nous proposons d'utiliser plusieurs types de souris transgéniques, toutes issues de la souche sauvage C57BL6. Les souris transgéniques utilisées seront des souris mâles et femelles, dont on a modifié un gène de façon à ce que les récepteurs P2X4 soient absents d'un type cellulaire ou au contraire présent en plus grand nombre à la surface des cellules. Nous allons générer 8 types de souris présentant ces modifications (absence ou surexpression de P2X4) dans plusieurs types de cellules impliquées dans la douleur. Nous induirons chez ces animaux soit une douleur inflammatoire chronique modérée, soit une douleur neuropathique chronique modérée au niveau d'une des pattes arrière. Nous étudierons les effets sur les seuils de sensibilité douloureuse à des stimuli thermique et mécanique exercée sous la voûte plantaire de cette patte en conditions normales puis en conditions inflammatoires et neuropathies. Les animaux seront mis à mort dès la mise en place de la douleur chronique afin de limiter leur souffrance. Nous réaliserons des analyses *in vitro* à partir des tissus nerveux de ces souris afin de déterminer si le récepteur P2X4 de certaines cellules peut représenter une cible thérapeutique pour lutter contre les douleurs chroniques.

Il n'existe actuellement pas de méthode alternative permettant de remplacer l'utilisation de souris car ce projet repose sur la mesure de perception sensorielle par approche comportementale et fonctionnelle suite à la modification d'un gène. L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de

3984 souris C57BL/6 mâles et femelles, réparties en 8 lignées transgéniques différentes dont l'étude sera répartie sur les 5 années du projet. Afin de limiter le nombre d'animaux, chaque animal sera utilisé pour les études comportementales et/ou d'électrophysiologie *in vivo* mais aussi pour de nombreuses approches *in vitro* partir de nombreux prélèvements effectués post-mortem. Cela nous permettra de réduire au maximum le nombre de souris utilisées tout en conservant une significativité scientifique statistique (hétérogénéité interindividuelle). Ainsi, le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas 12 animaux. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Dans la mesure où notre projet porte sur l'étude sur la douleur, nous limiterons celle-ci autant que possible en particulier en définissant la durée minimale nécessaire pour établir la pathologie et procéder dès que possible aux approches post-mortem afin de limiter la souffrance au maximum.

13057 Pendant le développement de vaccins, hormones, antiparasitaires ou tout autres produits vétérinaires, des études sont réalisées afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de ces produits. Généralement, ces études consistent à administrer le produit puis à réaliser un suivi spécifique des animaux afin de déterminer tout risque potentiellement associé à l'administration : réactions générales, réactions locales au(x) site(s) d'injection, augmentation de la température corporelle... Les traitements sont réalisés conformément aux voies d'administrations, aux doses et aux schémas posologiques recommandés en fonction des informations disponibles sur la molécule et l'utilisation prévue. Généralement, un suivi sérologique est également réalisé pour évaluer l'efficacité du produit testé. Selon les études, d'autres suivis peuvent être réalisés afin d'évaluer l'efficacité : échographies, prélèvements de type urine, fèces, lait etc.

Ces études nécessitent l'utilisation d'animaux lorsqu'aucune méthode substitutive n'existe. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Au minimum 8 animaux par groupe sont inclus (nombre basé sur la pharmacopée européenne et ligne directrice en vigueur pour les vaccins).

En moyenne, par étude, 2 groupes au minimum sont inclus. De plus, il est réalisé :

- 3 études d'innocuité et efficacité sur 5 ans sur les équins et les camélidés (lamas...) (d'où l'utilisation de 48 animaux de chaque espèce sur 5 ans)
- 1 étude par an pour les lapins (d'où l'utilisation de 80 lapins sur 5 ans)
- 4 études par an pour les bovins, les caprins, les ovins (d'où l'utilisation de 320 animaux de chaque espèce sur 5 ans)
- 6 études par an pour les porcins (d'où l'utilisation de 480 animaux sur 5 ans)
- 7 études par an pour les volailles (poules, dindes, canards) (d'où l'utilisation de 560 animaux sur 5 ans).

Afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation adaptée à l'espèce et au stade physiologique sera dispensée avant la 1ère administration et/ou prélèvement. Tout au long de leur hébergement, les animaux auront des conditions d'hébergement adaptées et optimales (logement, environnement, alimentation, apport en eau, soins). Les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement seront vérifiés quotidiennement. Par ailleurs, afin d'augmenter leur bien-être, les animaux seront hébergés collectivement dès que possible et disposeront d'un environnement enrichi. Si les animaux doivent être hébergés individuellement, ils auront un contact visuel et/ou olfactif avec leurs congénères.

Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou toute autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

13058 Dans le cadre de la procédure de libération européenne et selon les référentiels réglementaires (monographies de la Pharmacopée européenne (Ph Eur.) et les rapports techniques de l'OMS) en

vigueur chaque lot de vaccin doit être contrôlé par une autorité de santé avant sa mise sur le marché.

Dans le contexte du développement de méthodes alternatives, une méthode sérologique sur l'animal doit être mise en place pour le contrôle de l'activité biologique des vaccins comprenant les composés diphtérie, tétanos et coqueluche acellulaire.

Tous les composés seront testés sur les mêmes animaux ce qui permettra une réduction du nombre d'animaux, la méthode d'épreuve de virulence sera substituée par un prélèvement de sang et dosage des anticorps pour vérifier l'efficacité de ces vaccins, d'où un raffinement de la méthode. Les cobayes sont hébergés dans des cages enrichies de tube PVC servant de cachette. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponibles ad libitum. La validation de cette méthode nécessite 1040 cobayes.

13059 Le diabète de type 2 (DT2) est un facteur de risque cardiovasculaire. Outre la cardiopathie ischémique (liée à l'atteinte athéromateuse des artères coronaires) et la cardiopathie hypertensive (secondaire à l'hypertension artérielle fréquemment associée au DT2), il existe une atteinte cardiaque directe, spécifique du diabète : la cardiomyopathie diabétique. Cette atteinte cardiaque spécifique associe une hypertrophie des parois ventriculaires, un trouble de la relaxation du muscle cardiaque et in fine une insuffisance cardiaque survenant chez un patient diabétique sans atteinte coronarienne ni hypertension artérielle. Les mécanismes physiopathologiques favorisant la cardiomyopathie diabétique restent mal connus. Plusieurs études montrent que la cardiomyopathie diabétique est associée à une altération du métabolisme énergétique cardiaque mais les rôles propres de la glucotoxicité (action néfaste de l'hyperglycémie sur le cœur) et de la lipotoxicité (action néfaste de l'excès d'acides gras libres sur le cœur, dans le cadre de la dyslipidémie associée au diabète) ne sont pas clairement établis. Nous disposons d'un modèle murin transgénique de diabète lipoatrophique (souris *Bscl2*^{-/-}) qui a la particularité de présenter une cardiomyopathie diabétique dont le déterminant quasi-exclusif est la glucotoxicité (données préalablement publiées). La poursuite des travaux sur ce modèle inclue notamment la recherche de facteurs permettant de réduire la glucotoxicité pour améliorer les paramètres cardiaques de la cardiomyopathie diabétique. Des approches pharmacologiques sont en cours d'exploration mais des approches reposant sur l'hygiène de vie, notamment l'activité physique, sont également intéressantes. Concernant les modalités de l'activité physique, l'activité physique fractionnée à haute intensité (Highly Intensive Intermittent Training-HIIT) a récemment été reconnue comme une alternative intéressante à un exercice modéré continu (Moderate-Intensity Continuous Training-MICT). La HIIT se définit par une activité physique intense (proche de la VO₂max) réalisée à intervalles brefs et entrecoupée de courtes périodes de faible activité ou de repos. L'HIIT a montré sa supériorité, par rapport à une activité physique conventionnelle d'endurance, sur l'amélioration des paramètres de l'insuffisance cardiaque chez l'homme. Ainsi, le but de cette étude est d'explorer l'éventuel effet bénéfique de l'HIIT, en comparaison au MICT, sur les paramètres cardiaques de la cardiomyopathie diabétique. Les mécanismes impliqués dans l'éventuel effet cardio-protecteur de cet entraînement seront également explorés.

Les explorations seront réalisées sur des souris *Bscl2*^{-/-} (diabète lipoatrophique et cardiomyopathie diabétique) de 6-8 semaines d'âge, en comparaison à des souris bien portantes de même âge. Les souris *Bscl2*^{-/-} et les souris bien portantes seront divisées en 3 groupes : (i) HIIT ; (ii) MICT et (iii) absence d'activité physique (groupe contrôle CTL).

L'effet cardiaque dans les groupes HIIT, MICT et CTL sera évalué par échocardiographie, IRM cardiaque et micro-TEP 18FDG, réalisés à l'état de base puis après 2 et 4 semaines d'activité physique. Ces examens d'imagerie seront réalisés sous anesthésie générale induite et maintenue par de l'isoflurane inhalé. L'évolution du poids corporel, de la prise alimentaire, des glycémies capillaires sera également analysée, de même que la tolérance à l'effort. Enfin, après mise à mort des animaux, des analyses moléculaires seront réalisées sur le cœur, pour caractériser notamment les variations d'O-GlcNacylation, une voie métabolique accessoire du glucose qui pourrait être impliquée dans les modifications cardiaques liées à la glucotoxicité. La mise à mort sera effectuée sous anesthésie profonde à l'isoflurane (5%), suivi de la mise à mort par dislocation cervicale.

Des analyses statistiques seront réalisées afin de rechercher des différences entre les différents protocoles d'activité physique et entre les différents groupes de souris.

Afin de respecter la règle des trois R, les procédures expérimentales prévues dans le cadre de cette recherche ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum, selon les calculs d'effectifs effectués, et des tests statistiques appropriés seront utilisés afin de mettre en évidence les résultats attendus. Le remplacement n'est pas possible dans cette étude car les analyses morphologiques et moléculaires nécessitent un animal vivant et un organe complet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV) avec une pression de 20-25Pa avec un renouvellement de 25 fois le volume d'air de la pièce toutes les heures et une température de $21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. La litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux permet de réduire le niveau de stress. Cette litière est plus chère mais possède les avantages d'être peu poussiéreuse, moins allergisante que le résineux. Les animaux sont hébergés par groupe de 5 afin de conserver les interactions sociales. La litière est enrichie avec de la litière cellulose permettant la confection de nid ainsi qu'une cabane en carton leur permettant de se cacher durant la période d'exposition à la lumière. A la suite des procédures, un suivi régulier quotidien est effectué par du personnel formé et expérimenté jusqu'à mise à mort de l'animal. La perte de poids (plus de 10% par rapport au poids initial), l'aspect des poils et le comportement de l'animal par rapport à ses congénères seront surveillés quotidiennement. L'évaluation du bien-être de l'animal se fera selon les recommandations de la "Mouse Grimace Scale" après chaque entraînement physique, dans l'heure suivant le réveil de chaque anesthésie générale nécessaire aux examens d'imagerie ainsi que le lendemain. Si un animal a un score strictement supérieur à 4 selon cette échelle, la procédure de mise à mort sera effectuée.

On prévoit ainsi l'utilisation de 84 souris.

13060 Le but général est de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes approches thérapeutiques. Le travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, des modèles cellulaires ont été utilisés dans un premier temps pour étudier les gènes dérégulés et pour faire un criblage de plusieurs composés thérapeutiques afin de sélectionner le meilleur. Il est maintenant prévu d'utiliser des souris mimant la dystrophie myotonique de type 1 pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie dans ce modèle vivant.

Il a été précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Une approche thérapeutique a été développée en utilisant un composé injectable capable de diminuer le niveau de dynamine 2. Chez des souris malades affectées par une myopathie et injectées avec ce composé, leur rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie ont été obtenus. Notre but est maintenant d'appliquer cette approche thérapeutique à d'autres maladies musculaires (dystrophies), plus particulièrement à la dystrophie myotonique de type 1 (DM1). De plus, il a également été montré qu'un autre gène, appelé Bin1 est aussi dérégulé dans DM1.

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est la forme la plus commune de dystrophie musculaire chez les adultes, avec une incidence de 1 :15000, se caractérisant notamment par une atteinte musculaire sévère et progressive, des défauts cardiaques et des déficits cognitifs. A ce jour, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, de mieux comprendre leur développement et de tester des thérapies. Ces effets ne

peuvent être observés que sur un organisme vivant, c'est pourquoi nous utiliserons des souris. Aucune alternative expérimentale n'existe. Les souris seront analysées *in vivo* et *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REMPACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum deux par jour avec un temps de repos adéquat) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Ainsi, un maximum de 213 souris sera utilisé. Une surveillance quotidienne permettra de repérer précocement les signes de souffrance/douleur/stress. Afin d'améliorer le bien-être animal tout au long de la vie de l'animal, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (ajout de matériel pour faire un nid), le regroupement des animaux de même sexe pour limiter l'isolement et favoriser le comportement social. De la nourriture adaptée à ce modèle de souris sera utilisée. Lors de l'expérimentation, tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance à l'animal. Pour les procédures expérimentales invasives, plusieurs mesures seront prises pour maintenir le bien-être animal comme le recours à l'anesthésie et l'utilisation d'un tapis chauffant afin de maintenir la température corporelle des animaux si la procédure expérimentale implique une anesthésie. Toujours en cas d'anesthésie, les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet puis suivis ensuite quotidiennement via une fiche scoring pour définir les points limites permettant de limiter la souffrance, la douleur et le stress (RAFFINEMENT).

13061 Le vieillissement est un phénomène physiologique. Depuis plus de 15 ans de nombreux stimuli, comme le stress métabolique, le stress oxydatif et le stress oncogénique, font apparaître un vieillissement accéléré, prématuré. Au niveau cellulaire on parle alors de sénescence. La sénescence peut être considérée comme un mécanisme de sauvegarde lorsqu'elle est sporadique car elle permet alors l'élimination de cellules ayant subi des dommages suite à différents stress. On a alors un processus anti-cancéreux. Par contre lorsque cette sénescence devient chronique elle induit massivement la sécrétion de nombreux facteurs qui vont alors être impliqués dans de nombreuses pathologies comme les troubles métaboliques, la carcinogenèse, les troubles neurodégénératifs notamment. Eliminer les cellules vieillissantes suite à ces différents stress devient une approche de plus en plus mise en avant, avec le développement de molécules dites sénolytiques. Ces molécules sénolytiques vont induire spécifiquement la mort des cellules sénescents. La recherche de molécules de ce type grâce au criblage de banque de molécules chimiques se développe de plus en plus. L'idée de ce protocole est de valider *in vivo* les molécules découvertes comme sénolytiques en utilisant un modèle murin qui permettra de suivre de façon longitudinale la sénescence au sein de l'animal. Différents protocoles connus pour induire la sénescence seront utilisés. L'administration d'extrait de fumée de cigarette ou l'administration de Bléomycine va alors induire de la sénescence au niveau pulmonaire et provoquer l'apparition de l'emphysème. L'administration de la molécule CCl₄ dans un contexte de NASH (diète riche en graisse, sucre et cholestérol, avec de l'eau sucrée) induit de la sénescence au niveau hépatique, provoquant également l'apparition d'hépatocarcinomes. Le traitement cutané avec des molécules chimiques (DMBA/TPA) va induire de la sénescence au niveau de la peau ainsi que l'apparition de lésions de type papillomes. Enfin, pour mimer l'importance de la sénescence lors de la chimiothérapie chez le patient, de la Gemcitabine sera injectée. Nous suivrons alors les effets des différentes molécules sénolytiques tant au niveau de la sénescence cellulaire qu'au niveau de l'évolution des différentes pathologies associées à ces différents protocoles.

Remplacer : ce projet est basé sur de nombreuses études *in vitro*, qui nous permettent de savoir précisément les mécanismes mis en jeu. Cependant, à ce stade des recherches, l'utilisation de modèles complexes, i. e. d'animaux vivants, est requise avant d'envisager une application clinique. Nous utiliserons au maximum 1760 souris pour ce protocole, réparties dans 12 procédures.

Réduire : le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Enfin l'utilisation d'un modèle permettant de suivre longitudinalement l'évolution du vieillissement chez un même individu permet de réduire considérablement le nombre d'animaux inclus dans ce protocole.

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

13062 Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un petit téléostéen de 3 à 4 cm de la famille des Cyprinidés, originaire de l'Inde et de la péninsule Malaisie. Son élevage est extrêmement facile et chaque femelle peut pondre de 100 à 200 œufs par semaine. La fécondation et le développement des embryons se fait ex utero et rapidement puisque la plupart de ses organes sont mis en place au cours des 24 premières heures du développement. La relative transparence des embryons permet également de suivre l'organogénèse avec une résolution cellulaire. C'est la combinaison de son embryologie bien caractérisée et de la puissance de sa génétique qui fait du poisson zèbre un des modèles vertébrés les plus favorables pour la recherche en biologie. En effet, la véritable force du modèle poisson zèbre a été prouvée par l'utilisation de cribles génétiques directs à grande échelle qui ont permis d'identifier des mutants dans pratiquement tous les organes ou types cellulaires. Les méthodes puissantes de génétique inverse telles que la transgénèse, ou les techniques d'édition du génome par les TALEN et le système CRISPR/Cas9 sont applicables au poisson zèbre. L'ensemble de ces caractéristiques et le fait que 70% des gènes humains aient au moins un orthologue chez le poisson zèbre en font un modèle de choix pour l'étude du développement, mais également pour la recherche translationnelle

Le projet a pour objectif l'étude de gènes connus pour leur implication dans des pathologies humaines telles les anomalies du développement et le cancer. Pour cela, le modèle poisson zèbre est utilisé comme modèle expérimental afin de comprendre la fonction de ces gènes *in vivo* au cours du développement.

Le nombre de poissons zèbres utilisé dans le cadre du projet est de 1000. Les animaux sont utilisés pour répondre à des questions biomédicales pour lesquelles les modèles *in vitro* et *in silico* ne peuvent pas apporter de réponse. Le nombre de poissons zèbres nécessaires à chaque expérience est déterminé par l'utilisation de statistiques et maintenu au strict minimum. Les poissons zèbres sont élevés dans un environnement social et physique approprié.

13063 Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé (définition de l'organisation mondiale de la santé). En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, dont les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Face à ce problème majeur de santé publique, plusieurs approches sont utilisées, dont l'utilisation de compléments alimentaires permettant de limiter la prise de poids et/ou les désordres métaboliques associés à l'obésité (par exemple l'insulino-résistance) ainsi que l'augmentation de l'activité physique.

Dans ce projet, nous chercherons à mettre en évidence l'effet d'ingrédients de composition confidentielle associé ou non avec l'exercice physique, sur l'obésité et l'insulinorésistance, dans le but ultime de développer un complément alimentaire chez l'homme et de chercher un éventuel effet synergique lors d'une association avec l'exercice physique.

Nous étudierons l'effet biologique de l'extrait en utilisant un modèle d'obésité induite par l'alimentation (régime apportant 45% de l'énergie sous forme de lipides supplémenté ou non avec un ingrédient à tester, à 2 doses différentes) chez des souris C57Bl6 mâles. La durée du régime sera de 12 semaines.

Pour une des formulations, l'effet de l'association avec l'activité physique sera testé.

Au total, 11 groupes expérimentaux (n=9 souris par groupe) seront nécessaires pour mener à bien cette étude.

Dans les groupes où l'effet de l'activité physique sera évalué, les cages seront équipées d'une roue reliée à une interface informatique permettant d'enregistrer en continu le nombre de tours effectués au cours du temps.

Le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques sera caractérisé de la façon suivante :

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire toutes les 2 semaines ;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique après 6 semaines et 12 semaines de régime ;
- collection de fèces en début puis après 6 et 11 semaines de régime pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime ;
- mesure de la réponse glycémique en réponse à l'insuline pour mettre en évidence un dysfonctionnement de la réponse à l'insuline après 11 semaines de régime.

A l'issue des études, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie générale pour prélèvement d'organes dans l'optique de caractériser les effets biologiques dans différents tissus.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 R :

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

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

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. Les animaux seront hébergés en cage de 3 individus, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft). Concernant les groupes où l'effet de l'activité physique sera évalué, les cages seront équipées d'une roue d'exercice (en matière plastique sans barreaux pour éviter les blessures) à laquelle les animaux pourront librement accéder. L'activité mesurée sera donc une activité spontanée. Une crème anesthésique sera appliquée localement avant incision et prélèvement de sang à la queue. Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress.

13064 Aujourd'hui, la chimiothérapie et la radiothérapie restent les traitements de référence dans la majorité des cas de cancer. Or l'efficacité de ces traitements est dépendante de la réponse immunitaire anti-tumorale qu'ils déclenchent. Grâce à un modèle informatique prédictif, nous avons identifié plusieurs agents potentiellement capables, en tuant les cellules cancéreuses, d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale. Parmi ces agents figure une chimiothérapie utilisée en clinique pour traiter des cancers de l'enfant. *In vitro*, nous avons étudié les mécanismes induits par cette chimiothérapie et avons confirmé qu'elle active différents mécanismes précurseurs de l'activation des cellules immunitaires, mais cela doit être confirmé *in vivo* dans un organisme entier.

L'objectif du présent projet est donc de déterminer par quels mécanismes cette chimiothérapie est capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale. Cela pourra permettre l'émergence de nouvelles stratégies de traitements anti-cancéreux. Cela permettra par ailleurs de mieux comprendre les mécanismes d'activation du système immunitaire par ce traitement et donc de mettre en place des thérapies ciblées, en complément aux chimiothérapies immunogènes afin d'augmenter leur efficacité.

Ce projet d'une durée de 2 ans consistera à implanter sous la peau de souris sous anesthésie des cellules tumorales, de traiter les tumeurs avec notre chimiothérapie d'intérêt puis de sacrifier les souris pour récupérer et analyser les tumeurs, ce qui nécessitera 80 animaux, en incluant les groupes contrôles.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Ce projet ayant pour objectif de vérifier que les mécanismes induits dans une cellule tumorale *in vitro* le sont aussi dans les cellules évoluant dans leur environnement tumoral, il est absolument nécessaire de travailler sur un organisme dans son ensemble. En effet, nous avons identifié des mécanismes induits par notre traitement d'intérêt *in vitro*. Nous avons par

ailleurs montré que ce traitement induit une réponse immunitaire anti-tumorale. Ce projet a pour objectif de vérifier que les mécanismes induits dans les cellules tumorales *in vitro* le sont aussi dans les cellules dans leur environnement tumoral et constituent ainsi des mécanismes précurseurs de l'activation du système immunitaire. Pour cela, il est absolument nécessaire de travailler sur un organisme vivant, dans son ensemble.

Pour ce projet, nous avons choisi le modèle souris. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé à l'aide d'un modèle statistique dans le but d'utiliser le minimum de souris permettant d'observer une différence statistiquement significative. Le nombre de groupes proposé inclut les groupes contrôles nécessaires. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Par ailleurs, une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Les expérimentations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront manipulés dans le respect de leur bien-être. Concernant l'enrichissement du milieu, les animaux disposeront de nestlets et maisons dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. La surveillance régulière permettra le suivi du comportement (prostration, autoagression, etc) et de la croissance tumorale, afin, le cas échéant de mettre en place des soins ou d'arrêter les procédures (avec des points limite précoces).

13065 Mots clés: neuromélanine, sommeil, maladie de Parkinson, maladie neurodégénérative, vieillissement, modèle préclinique.

Durée du projet: 3 ans. Nombre d'animaux prévus: 70 souris.

Le trouble comportemental en sommeil paradoxal anticipe d'une décennie la maladie de Parkinson dont il est considéré aujourd'hui comme le meilleur marqueur précoce. Son étude chez l'animal doit permettre de comprendre son origine et d'élaborer des modèles précliniques récapitulant chronologiquement chaque étape conduisant à la maladie de Parkinson. De tels modèles font défaut pour le développement d'approches thérapeutiques visant à prévenir la progression de cette maladie neurodégénérative, un problème majeur de santé publique et de société.

Pendant le sommeil paradoxal, nous sommes naturellement paralysés. Or, cette paralysie est absente chez les patients atteints du trouble comportemental en sommeil paradoxal. Nous faisons l'hypothèse que la zone cérébrale contrôlant cette paralysie serait une cible précoce des processus pathologiques se propageant ensuite à l'ensemble du cerveau. Notre objectif est de tester cette hypothèse grâce à une souche de souris de type transgénique exprimant la neuromélanine, un pigment n'existant pas naturellement chez les rongeurs. Chez l'homme, les neurones pigmentés sont particulièrement ciblés par la dégénérescence liée à la maladie de Parkinson. Les études comportementales préliminaires indiquent que ces souris « humanisées » présentent effectivement des altérations motrices dès l'âge de 7-9 mois, dont la sévérité empire avec le vieillissement, indiquant un phénotype dommageable à 16 mois. Notre objectif est d'étudier la période pré-symptomatique pour caractériser l'apparition précoce, comme rapportée chez les patients, d'un trouble comportemental en sommeil paradoxal accompagné de perturbations du sommeil. Notre stratégie expérimentale consistera à analyser longitudinalement le cycle veille-sommeil, la survenue de mouvements anormaux pendant le sommeil paradoxal et l'activité locomotrice de l'éveil pendant la période pré-symptomatique (entre 3-12 mois d'âge). Les modifications de constantes physiologiques, locomotrices et comportementales seront examinées quotidiennement. Du fait du probable phénotype dommageable à terme chez ces souris, les expérimentations seront stoppées et elles seront mises à mort dès l'apparition de perturbations caractéristiques du trouble comportemental en sommeil paradoxal, bien en amont de la survenue des symptômes moteurs cardinaux de la maladie de parkinson. De nécessaires analyses anatomo-pathologiques seront enfin réalisées sur leurs cerveaux malades. L'intérêt de ce projet est qu'il pourrait valider un modèle préclinique récapitulant chronologiquement les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la maladie de Parkinson, offrant de nouveaux moyens de recherche à visée thérapeutique. Il est prévu d'utiliser un nombre maximal de 70 souris mâles et femelles, à parts égales, préparées sous anesthésie générale pour les enregistrements polysomnographiques (EEG, EMG et EOG) et

vidéos, non réutilisables car mises à mort dès la fin de la procédure expérimentale. Elles seront réparties en 2 lots de souris de type transgénique (n=20 et 15) et 2 lots de souris de type naturel (contrôle, n = 20 et 15) selon leur âge en début de procédure (2,5 ou 6 mois après la naissance, respectivement).

Nous répondrons explicitement aux principes et exigences des 3R:

Remplacement: L'intérêt d'étudier ces mécanismes physiopathologiques réside dans leur caractère prédictif et évolutif vers la maladie de Parkinson. Il est impossible d'aborder ces questions chez l'homme (sain ou malade), d'autant qu'aucun marqueur spécifique des mécanismes impliqués n'est encore validé en neuroimagerie. Des contrôles anatomo-pathologiques réalisés sur des biopsies de patients décédés mais des décennies après le déclenchement des processus pathologiques. Aussi, des modèles animaux comme celui développé dans ce projet sont requis pour reproduire les observations cliniques, les comprendre et les modéliser pour l'élaboration de stratégies préventives ciblées. Nos travaux seront conduits chez la souris, une espèce animale adaptée aux études longitudinales (faible prise de poids et de volume corporel avec l'âge), chez qui la transgénèse permet d'induire une expression de neuromélanine dont elles sont naturellement dépourvues. Enfin, les réseaux neuronaux responsables du sommeil paradoxal sont communs aux mammifères.

Réduction: Le nombre maximal de souris (n=70) est légitimé par l'étude longitudinale et l'utilisation d'animaux de type transgénique et naturel comme contrôle, appariés en sexe, en âge et en fond génétique. La taille des 4 lots expérimentaux a été calculée sur la base de nos études antérieures du cycle veille-sommeil chez cette même espèce animale et de manière à garantir la pertinence, la reproductibilité et la significativité statistique des données expérimentales (petits échantillons). Chaque animal sera mis à mort en fin de procédure pour les analyses anatomo-pathologiques, éliminant de fait toute possibilité de réutilisation.

Raffinement: Pour cette étude de caractérisation phénotypique, il est attendu dans un délai à déterminer par les expérimentations elles-mêmes que les souris de type transgénique développent un trouble comportemental en sommeil paradoxal, par rapport aux souris témoins. C'est pourquoi cette procédure est classée par précaution de sévérité modérée, d'autant plus que la lignée semble évoluer avec l'âge vers un phénotype dommageable (données préliminaires). Notre préoccupation sera d'analyser quotidiennement grâce à des fiches de scoring dévolues à cet effet l'évolution des paramètres physiologiques et neurologiques considérés et le comportement locomoteur des animaux pour détecter au plus tôt les perturbations caractéristiques de ce trouble décrites récemment par nos soins chez les rongeurs. Celles-ci constitueront de-facto le point limite des expérimentations avec mise à mort des animaux, tout en établissant la preuve de concept recherchée. De par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil requiert des animaux constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et d'expérimentation sont maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnels compétents, formés et suivis dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue l'expérimentation animale. Nous avons prévu des procédures appropriées de récupération de la chirurgie implantatoire sous anesthésie puis d'habituation aux conditions d'enregistrement dans le but de réduire au maximum le stress et l'inconfort.

13066 La maîtrise des gestes techniques expérimentaux réalisés sur les animaux de laboratoire est un gage de préservation du bien-être animal et de qualité scientifique. C'est également une obligation réglementaire pour toute personne amenée à mettre en œuvre des procédures expérimentales. Ce projet a pour objectif de couvrir les besoins en formation du personnel dans le cadre de la formation initiale ou du maintien des compétences et ces formations sont documentées. Ce projet permet de garantir la meilleure préparation du personnel à la mise en œuvre des procédures expérimentales ainsi que la manipulation des animaux selon les bonnes pratiques vétérinaires au sein de notre Etablissement Utilisateur. Les gestes réalisés (par exemple : administration, prélèvement) seront associés à une contrainte au maximum « modéré ». En fonction du geste technique considéré, les animaux seront anesthésiés dans le premier temps de la formation et une analgésie sera également mise en place.

Dans les cas où cela est possible, les formations seront réalisées, selon l'ordre suivant :

- sans avoir recours à l'animal vivant : en s'appuyant sur la littérature (supports vidéo, photos), sur des matériaux synthétiques, ou en utilisant des animaux euthanasiés issus d'autres projets,
- avec recours à l'animal vivant lorsque cela est indispensable : en utilisant des animaux de réserve ou animaux issus d'une procédure expérimentale antérieure et répondant aux critères de réutilisation,

Si aucun animal n'est disponible, des animaux pourront être commandés spécifiquement pour les besoins de formation.

Afin de réduire le nombre global d'animaux utilisés dans notre Etablissement Utilisateur, les prélèvements effectués dans le cadre de la formation pourront être conservés en vue d'études sur cellules ou tissus et/ou organes isolés. Les animaux pourront également être réutilisés pour d'autres études après une période de récupération et avis favorable d'un vétérinaire en accord avec les principes de réutilisation indiqués dans la réglementation. Enfin, certains animaux pourront être proposés à l'adoption ou placés dans un autre centre prévu à cet effet.

Les études réalisées au sein de l'Etablissement Utilisateur sont encadrées par des consignes établies et validées par le Comité d'Ethique, intégrant tous les aspects en lien avec l'utilisation des animaux, et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Le nombre d'animaux utilisés (provenant d'autres projets notamment pour les grandes espèces) sur 5 ans sera au maximum de : 500 souris, 500 rats, 100 cobayes, 100 lapins, 100 chiens, 50 porcs.

13067 La chirurgie par coelioscopie se développe beaucoup depuis 1988, essentiellement en pathologie digestive, mais aussi gynécologique, urologique...

Son principe fondamental, est d'éviter une large ouverture de l'abdomen, requise dans la chirurgie « classique » réalisée par laparotomie. Pour cela une tige optique de 10 mm de diamètre est introduite dans l'abdomen. Elle éclaire et permet à une caméra vidéo (de quelques grammes à peine) de filmer les mouvements des instruments placés dans l'abdomen par des incisions de 5 et 10 mm, que le chirurgien manipule de l'extérieur du ventre et qu'il contrôle sur un écran de télévision.

Sa réalisation nécessite une anesthésie générale. L'abdomen est d'abord ponctionné par une aiguille fine servant à insuffler du gaz carbonique, sous pression contrôlée. Les organes intra-péritonéaux sont alors accessibles à l'examen et à la manipulation. Bien entendu, une instrumentation spécifique, sophistiquée, est requise : pour l'insufflation, pour la transmission des images, pour les gestes chirurgicaux...

Ses avantages sont multiples : en manœuvrant l'optique par une incision de 10 mm, le chirurgien peut explorer des régions très distantes dont l'examen par laparotomie requiert une grande incision. La suppression de l'incision classique diminue beaucoup la douleur post-opératoire, permet une reprise plus précoce de l'activité, ce qui réduit certains risques (phlébites, infections pulmonaires). L'avantage cosmétique est évident. De surcroît, il semble bien que l'absence d'exposition à l'air des anses intestinales, leur moindre mobilisation soient des facteurs de récupération rapide d'une activité intestinale normale, donc de l'alimentation, accélérant la convalescence.

La coelioscopie ne modifie pas le principe de l'intervention, mais l'accès au site opératoire, où se déroule l'acte chirurgical proprement dit, est différent de celui de la chirurgie classique. L'assistance robotique permet de faciliter la coelioscopie en utilisant un outil, le robot, qui permet au chirurgien d'améliorer son geste opératoire par un gain en :

- Qualité de vision : caméra stéréoscopique donnant la vue en 3 dimensions, donc des reliefs et des volumes.
- Précision : instruments fins et très maniables avec 7 degrés de liberté, reproduisant les possibilités de mouvements du poignet et de rotation de la main.
- Confort : le chirurgien est assis à une console de commande par manettes et pédalier, d'où il dirige à distance les mouvements du robot. Le robot reproduit en simultané les gestes opératoires que réalise le chirurgien aux commandes

L'utilisation du robot demande un apprentissage long et intensif. Cette prise en main passe par l'utilisation de Simulateurs qui miment en tout point l'utilisation du robot. Cette formation : « chirurgie viscérale assistée par robot chez le porc » a pour but de valider la maîtrise de cette technique micro-invasive par les internes en chirurgie viscérale. Elle est un passage incontournable avant l'utilisation chez l'homme.

Nous utiliserons des porcs charcutiers femelles ou mâles castrés de 45 à 60kg à raison de 1 par mois sur 3 ans soit 36 porcs. Chaque porc permettra la formation de 4 à 5 internes. Les interventions pratiquées seront:

-Chirurgie de l'appareil urinaire : néphrectomie, cystectomie, cystotomie, urétrectomie.

-Chirurgie de l'appareil digestif : oesophagectomie, colectomie, gastrectomie.

-Chirurgie de l'appareil reproducteur : prostatectomie, ovariectomie, hystérectomie.

Dans le cadre de la règle des 3Rs :

Remplacer : L'animal est ici le maillon final d'une formation, l'apprentissage des repères anatomiques, des gestes opératoires et de la maîtrise du robot seront effectués à travers des vidéos et des simulateurs.

Réduire : Plusieurs chirurgiens seront formés par session afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, suivant la dextérité des intervenants 4 à 5 chirurgiens par animal pratiqueront différentes interventions.

Raffiner : la formation *in vivo* ne sera réalisée qu'après une phase de formation théorique et *in vitro* à l'utilisation du robot. Les porcs seront prémédiqués de façon appropriée et l'ensemble des gestes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale monitorée avec analgésie morphinique. L'ensemble des actes sera encadré par un chirurgien senior. La procédure sera sans réveil avec mise à mort par surdose d'anesthésie (confirmé par le monitoring: ECG plat). Les porcs arriveront 7 jours avant l'intervention et seront hébergés en enclos intérieur sur caillebotis plastiques, leur espace de vie sera enrichie par des jouets dédiés type balle à bruit et disque à mordre. L'ensemble des procédures chirurgicales sera supervisé par un chirurgien expert en chirurgie robotique humaine et porcine.

13068 Le but de ce projet est l'entretien d'une lignée de souris génétiquement modifiée. Ce projet utilise des souris *mus musculus*. Le choix de cette espèce est motivé par les limites des techniques de transgénèses ciblées. Seule cette espèce peut être génétiquement modifiée.

Le nombre d'animaux nécessaire pour entretenir la lignée est évalué à 180.

Dans le cadre de nos travaux sur la dystrophie musculaire causée par des mutations dans un gène codant une protéine nucléaire, notre équipe a développé un modèle murin (souris) génétiquement modifié portant une mutation ponctuelle décrite chez des patients atteints de cette pathologie. Ce modèle murin récapitule la pathologie humaine et plus particulièrement le phénotype du muscle strié. L'utilisation de ce modèle nous permet de disséquer les mécanismes moléculaires et les voies de signalisations impliquées dans l'apparition du phénotype mais aussi d'étudier la physiologie du muscle squelettique et cardiaque. L'ensemble de ces travaux ayant pour but de mieux comprendre cette pathologie et de concevoir des approches thérapeutiques innovantes ; thérapies géniques et/ou cellulaires mais aussi pharmacologiques. Les procédures expérimentales utilisées à ces fins seront décrites dans des demandes d'autorisations spécifiques, celles-ci concernant uniquement l'entretien de la lignée en animalerie.

Afin de réduire le nombre de souris générées, le nombre de croisements est contrôlé et seul des croisements donnant des génotypes d'intérêt sont réalisés. Les animaux sont stabulés suivant un programme d'enrichissement permettant la nidification, le jeu et le repos, mis en place au sein du centre d'élevage. Les souris sont sacrifiées à un âge limite en amont du développement d'un phénotype dommageable.

13069 Différentes pathologies affectent les réseaux vasculaires de l'œil. Ces pathologies peuvent entraîner l'apparition de néovaisseaux au niveau de la rétine (rétinopathie du prématuré et

diabétique), de la choroïde (DMLA humide), ou un ralentissement de la circulation (occlusion artérielle ou veineuse) ou enfin un œdème rétinien par exemple. Ces pathologies entraînent donc des altérations visuelles graves et peuvent mener à la cécité. Il apparaît donc essentiel de bien comprendre le fonctionnement du réseau vasculaire de l'œil et de découvrir des thérapeutiques efficaces.

Dans cette étude, nous allons tester l'efficacité de molécules sur des modèles murins de ces pathologies. Ces pathologies seront induites sur des souris normales par une surexposition des animaux à l'oxygène (modèle de la rétinopathie du prématuré) ou à l'aide d'impacts laser ciblés au niveau de l'œil (DMLA humide et occlusion veineuse).

L'efficacité des traitements sera évaluée *in vivo* par imagerie (ophtalmoscope laser à balayage) et post mortem par des analyses microscopiques et immunohistologiques.

Au total 3820 animaux seront nécessaires à cette étude sur 5 ans en incluant les contrôles.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; l'efficacité des molécules thérapeutiques ne peut être évaluée *ex vivo*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergées dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Pour les injections intraoculaires, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré-opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien être.

13070 La prévalence du diabète de type 2 est en constante augmentation au niveau mondial. Cette pathologie est caractérisée par une augmentation de la glycémie associée à une diminution de l'action de l'insuline, ou insulino-résistance, dans les tissus périphériques. Il a été montré d'autre part qu'il y avait une altération de la fonction barrière de l'intestin chez les patients diabétiques, et que cette altération pourrait être impliquée dans l'établissement de l'inflammation de bas grade qui caractérise cette pathologie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la part respective de l'hyperglycémie et de l'insulino-résistance dans les altérations de la fonction barrière de l'intestin. Pour cela nous allons étudier la fonction barrière intestinale dans un modèle murin d'insulino-résistance généralisée et d'hyperglycémie induit par un traitement avec un inhibiteur du récepteur de l'insuline, et en situation d'insulino-résistance en absence d'hyperglycémie chez des animaux traités à la fois par l'inhibiteur du récepteur de l'insuline et par une molécule pharmacologique hypoglycémiante. La fonction barrière de l'intestin étant étroitement dépendante du microbiote présent dans la lumière digestive et du système immunitaire sous-jacent à la muqueuse, cette étude ne peut s'affranchir de l'utilisation d'animaux afin de comprendre ce mécanisme dans son intégralité.

Dans ce projet nous utiliserons 60 souris. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Les protocoles ont été élaborés pour utiliser le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants (10 animaux par groupe). Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des ponts limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

13071 Le syndrome de Wolfram (SW) est une affection neurodégénérative rare caractérisée par un diabète de type I, un diabète insipide, une atrophie optique et une surdité. Environ 300 cas ont été décrits et la prévalence est estimée à 1/160 000. Les modèles murins conçus jusqu'à présent ne développent pas exactement les mêmes symptômes que l'humain. J'ai donc généré une nouvelle souris dans l'espoir qu'elles miment les symptômes humains. L'audition de ces souris a été mesurée dans le projet précédent et a montré une surdité progressive apparaissant précocément au cours

de la vie de ces animaux. Les partenaires protéiques de la wolframine (protéine responsable du syndrome de Wolfram quand elle est absente) ont été identifiés et caractérisés.

Le projet consiste à déchiffrer les mécanismes moléculaires à l'origine de la perte des cellules sensorielles et de développer des stratégies thérapeutiques adaptées (thérapies génique et/ou pharmacologique). L'efficacité des stratégies thérapeutiques sera analysée en mesurant l'audition (Potentiels évoqués auditifs) et la vision (Potentiels évoqués visuels, optocinétique) des animaux avant et après traitement (génique ou pharmacologique).

Un total de 1290 souris sera nécessaire pour la réalisation de ce projet.

Les animaux seront hébergés dans des conditions respectant le bien-être animal. Le milieu sera enrichi avec des igloos, des batonnets de coton et des copeaux. L'état des animaux sera suivi quotidiennement.

Afin de respecter la règle des 3R, je limiterai aux seules expériences considérées comme absolument indispensables le recours aux animaux (Réduire). J'analyserai autant que possible l'audition et la vision sur les mêmes animaux afin de réduire leur nombre. J'étudierai l'efficacité des approches géniques et pharmacologique systémique sur l'audition et la vision chez les mêmes animaux. Je prélèverai également les organes sur les mêmes animaux (oreille, oeil, cerveau, pancréas etc...). Je réduirai, supprimerai ou soulagerai l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'anxiété subie par les animaux (Raffiner). Je ne peux malheureusement pas remplacer les animaux par d'autres modèles cellulaires ou *in silico* car je travaille sur un système intégré qui nécessite l'étude des réseaux auditifs.

13072 Les pathologies de la surface oculaire représentent un des principaux motifs de consultation pour douleurs oculaires en Ophtalmologie. Cette pathologie du segment antérieur de l'œil est caractérisée par des sensations de douleurs variables dans leur intensité allant du simple inconfort à une douleur oculaire prononcée. Les douleurs oculaires sont très invalidantes et difficiles à traiter et leurs mécanismes physiopathologiques demeurent de nos jours mal connus. Ce constat impose un approfondissement de nos connaissances fondamentales sur l'anatomie du système nociceptif cornéen et sur les mécanismes cellulaires impliqués dans l'initiation et la chronicisation de la douleur oculaire. L'éventail thérapeutique permettant de lutter contre la douleur oculaire reste actuellement très limité, allant de la simple instillation de larmes artificielles, d'agents anti-inflammatoires ou immunomodulateurs locaux, la prise par voie générale de médicaments à visée antalgique. Nous avons récemment montré qu'une augmentation des niveaux d'opioïdes endogènes au niveau de la surface oculaire diminue fortement la douleur dans plusieurs modèles précliniques de douleur oculaire. Ces effets analgésiques sont médiés par l'activation de récepteurs opioïdiques. Ce programme de recherche vise désormais à évaluer les effets analgésiques d'agonistes opioïdiques dans différents modèles de douleur oculaires développés chez la souris et d'identifier la nature des récepteurs opioïdiques mis en jeu.

Ce programme nécessite l'utilisation de 525 souris (mâles et femelles) adultes C57Bl6/J. La douleur, étant définie comme une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable », ne peut évidemment pas être évaluée *in vitro*.

Les animaux impliqués dans cette étude seront examinés bi-quotidiennement par les expérimentateurs. Les animaux disposent d'un enrichissement dans leur cage (bâton à ronger et maison en carton). Enfin, le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

13073 Le traitement standard de la tuberculose associe 4 antibiotiques sur une durée de 6 mois. La longueur et la complexité du traitement ainsi que l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques sont des causes d'échec. Dans ce contexte, le but des recherches actuelles est de pouvoir bénéficier d'un nouveau traitement en raccourcissant la durée et en limitant l'émergence de souches résistantes. Les essais thérapeutiques de nouveaux traitements antituberculeux chez l'homme sont très longs et limités par la variété des profils de résistance des souches. Le modèle

murin, utilisé en chimiothérapie de la tuberculose, permet de tester différentes hypothèses qui peuvent ensuite être confirmées chez l'homme voire même utilisées directement.

Notre projet recouvre l'ensemble des expérimentations à réaliser *in vivo* dans le modèle murin pour étudier l'activité de nouveaux antibiotiques contre *M. tuberculosis*. En application de la règle des 3R, les composés seront dans un premier temps sélectionnés *in vitro* car seuls les composés les plus actifs contre *M. tuberculosis* seront testés *in vivo*.

Pour chaque expérience décrite ci-dessous, les animaux seront infectés par voie intraveineuse par une souche de *M. tuberculosis* puis traités par voie orale ou par voie sous-cutanée. Les critères de jugement d'efficacité des composés seront la survie des animaux traités en comparaison aux témoins non traités et la charge bacillaire pulmonaire en fin de traitement en comparaison à celle du premier jour du traitement et à celle des témoins.

La 1^{ère} expérience consiste à déterminer la dose minimale effective des composés actifs sur *M. tuberculosis* chez les souris BALB/C/J. Nous estimons qu'au maximum 7 composés seront testés avec 5 posologies chacun en comparaison à des témoins non traités et des témoins traités par un antibiotique de référence. Selon la règle des 3 R, 6 souris sont nécessaires par groupe. Le groupe témoin non traité sera constitué de 6 souris qui seront sacrifiées le lendemain de l'inoculation pour estimer la charge bacillaire de départ et de 6 souris qui seront sacrifiées après traitement d'un mois (soit 12 souris au total). Les groupes traités (6 souris par posologie soit 30 souris par composé + 6 souris traitées par l'antibiotique de référence) seront sacrifiés à la fin du mois de traitement. Pour l'étude de 7 composés, 222 souris traitées + 12 souris témoins non traitées sont nécessaires soit au total 234 souris.

La 2^{ème} expérience consistera à étudier les nouveaux composés en association chez des souris Swiss. Les 4 composés les plus efficaces sélectionnés lors de l'expérience 1 seront évalués ici. Chaque nouvelle molécule sera testée en association avec un antituberculeux déjà existant puis avec une des nouvelles molécules sélectionnée dans un second temps. Le traitement durera 1 mois. La fréquence d'administration pourra varier selon la demi-vie des molécules et être au plus de 4 administrations par jour 5 jours par semaine et au moins de 1 administration par semaine. La première partie de l'expérience consistera à tester chaque nouvelle molécule avec un antituberculeux connu. La deuxième partie de l'expérience consistera à tester les nouvelles molécules en association entre elles.

Selon la règle des 3 R sur la réduction du nombre d'animaux, 10 souris sont nécessaires par groupe. Le groupe témoin non traité comporte 10 souris qui seront sacrifiées le lendemain de l'inoculation pour estimer la charge bacillaire de départ, 10 souris qui seront sacrifiées le jour du début de traitement et 10 souris qui seront sacrifiées en fin de traitement d'un mois. Les groupes traités seront sacrifiés à la fin du mois de traitement. Pour la première partie, 8 associations seront testées pour une nouvelle molécule (80 souris) en comparaison aux antibiotiques en monothérapie (80 souris) et au groupe contrôle non traité (30 souris) soit un total de 190 souris. 4 composés seront testés au maximum pour un total de 760 animaux. Pour la deuxième partie, 6 associations seront testées pour les 4 meilleures molécules (60 souris) en comparaison avec les molécules en monothérapie (40 souris) et au groupe témoin (30 souris) soit un total de 130 souris.

La 3^{ème} expérience consistera à tester l'activité stérilisante des meilleures associations d'antibiotiques identifiées lors de l'expérience 2 (au maximum 4 associations) chez des souris Swiss. Les souris seront traitées pendant 3 ou 4 mois pour les associations de nouvelles molécules ; et 4 et 6 mois pour le traitement standard de la tuberculose. Les groupes traités seront ensuite laissés en observation sans traitement pendant une période de 3 mois pour évaluer l'apparition des rechutes. Les rechutes reflètent l'activité stérilisante du traitement, c'est-à-dire sa capacité à tuer l'ensemble des populations bacillaires.

Selon la règle des 3 R sur la réduction du nombre d'animaux, 10 souris sont nécessaires par groupe traité et 25 souris par groupe de souris en observation. Le groupe témoin non traité comporte 10 souris qui seront sacrifiées le lendemain de l'inoculation pour estimer la charge bacillaire de départ et 20 souris qui seront sacrifiées le jour du début de traitement. Pour une expérience, 380 souris

seront donc nécessaires. Au maximum et en fonction des résultats des autres expériences, 4 expériences d'évaluation de rechutes seront testées au maximum, soit 1520 animaux.

Au total sur le projet, 2644 animaux sont nécessaires.

L'observation matin et soir 7 jours/7 des animaux permet d'observer si un changement dans leur comportement habituel intervient (animal prostré, ne se nourrissant plus, poil piqué, ne se servant plus de l'enrichissement mis à sa disposition). Cette surveillance permet de détecter une éventuelle souffrance. Les paramètres sont suivis dans le cahier de laboratoire et si un changement intervient dans l'un de ces paramètres, la modification y est indiquée. Si un des paramètres cités précédemment est observé, l'animal est euthanasié par élongation cervicale.

13074 La néphropathie aux Immunoglobulines A (NlgA) est une maladie rénale chronique caractérisée par le dépôt des protéines produit par la système immunitaire (les immunoglobulines A) au niveau des glomérules, structure qui permet la filtration. Elle représente une cause majeure d'insuffisance rénale. L'incidence de cette maladie varie entre les régions géographiques ; il se trouve que le nombre des personnes atteintes de cette maladie est le plus élevé au Japon. On ignore la raison de cette augmentation de risque chez les japonais. Il a été montré que chez des patients souffrant de cette maladie, il existe une augmentation du taux de certaines bactéries dans l'intestin qui sont adaptées à digérer des sucres particuliers. On en trouve notamment dans les algues qui sont des aliments essentiels pour les Japonais.

Nous possédons des souris modifiées génétiquement qui développent spontanément la néphropathie aux IgA. Pour identifier le facteur environnemental qui augmente l'incidence de la maladie chez les Japonais, et pour mieux comprendre le mécanisme par lequel un régime alimentaire peut influencer le développement d'une maladie au travers de la flore intestinale, nous analyserons l'effet d'un régime riche en algues. Il a déjà été montré qu'un régime riche en algues a des effets spécifiques sur la flore intestinale, notamment en favorisant des bactéries adaptées à digérer des sucres trouvés sur les algues, comme celles retrouvées chez les malades avec la NlgA. Nous étudierons les souris sous régime riche en algues avec ou sans gavage de certaines bactéries adaptées à digérer les algues. Le régime riche en algues consiste en des croquettes avec 10% algues. On va, également, nourrir des autres souris avec un extrait d'algues, qui est soluble dans l'eau, par biberon uniquement. Les souris seront gavées en utilisant une sonde rigide et stérile, adapté à leur taille, avec un point arrondi pour éviter des perforations trois fois par semaine.

Ce projet nécessitera 240 animaux au total, avec 10 souris par groupe expérimental permettons des analyses statistiques plus robustes. Les phénotypes des souris utilisées dans ce projet sont non dommageables. Le régime riche en algues va durer de 1 à 3 mois pour chaque souris, et les souris seront euthanasiées en fin procédure pour permettre l'analyse de leurs reins.

Ce projet se déroulera sur une période de 2 ans.

La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront prise en compte : 1) Remplacement ; les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de l'interaction entre la flore intestinale et de la fonction rénale qui nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme. 2) Réduction ; dans ces différents modèles le taux de mortalité est faible (environ 2%), nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables de 10 par sous-groupe. 3) Raffinement, les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera systématique si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. Les signes extérieurs de souffrance (perte de poids au-delà de 20-25 % par rapport au groupe contrôle, prostration, poil hérissé, saignements, toux) seront les critères de point limites à partir desquels nous procéderons à l'euthanasie de l'animal.

L'objectif de ce projet permettra d'aboutir à une application thérapeutique qui est soit préventive soit active sur la progression de la maladie.

13075 Les infections urinaires (IUs) sont un motif très fréquent de consultation et de prescription d'antibiotiques. Elles peuvent être localisées dans les voies urinaires basses (cystite) ou hautes (pyélonéphrite). Elles sont dues, dans la majorité des cas, à une bactérie appelée *Escherichia coli* mais d'autres bactéries ou micro-organismes peuvent en être la cause. Pour traiter ces IUs, le choix d'antibiotique repose sur les caractéristiques du patient (sexe, âge, antécédents...) et la susceptibilité des germes aux antibiotiques. Plusieurs infections signalées ces dernières années impliquent des bactéries antibiorésistantes ou même multirésistantes. Un patient touché par de telles bactéries risque de se trouver dans une impasse thérapeutique en raison de l'échec des traitements habituels. Par ailleurs, le déficit d'investissements en de nouveaux antibiotiques susceptibles de les combattre rendent indispensable la recherche d'approches alternatives, parmi lesquelles la phagothérapie. Elle consiste à utiliser des phages, des prédateurs naturels des bactéries, pour lutter contre des infections bactériennes. La phagothérapie est intéressante pour de nombreuses pathologies telles que les infections urinaires, les maladies nosocomiales, les infections respiratoires ou ostéo-articulaires.

Cette étude comportera 1 procédure légère et 4 procédures modérées successives et interdépendantes. L'objectif est de caractériser dans un modèle préclinique murin (souris femelles âgées de 8 à 12 semaines) la répartition des phages dans les organes et d'étudier ensuite l'efficacité de la phagothérapie pour traiter les infections urinaires. Cette étude contribuera à évaluer une approche alternative dans la stratégie à déployer chez les patients atteints par des souches multirésistantes.

L'absence d'un modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire la majorité des interactions entre les phages, l'infection urinaire et le système immunitaire, nous oriente vers l'utilisation de modèles animaux. Les modèles murins sont prédictifs de la stratégie à déployer chez les patients.

Les souris seront infectées sous anesthésie générale. Elles seront examinées quotidiennement ce qui permettra d'établir un score clinique qui sera établi en fonction de l'observation de plusieurs paramètres : poids, comportement, posture. En fonction des observations et du score clinique, des interventions adaptées et préétablies seront mises en place: couverture chauffante, injection d'analgésique, réhydratation. Le score clinique permettra également d'identifier l'apparition des points limites précoces et de réduire la souffrance animale par mise à mort.

Par ailleurs, pour réduire le nombre de souris et améliorer la sensibilité et la spécificité du suivi de la cinétique d'infection/thérapie, les agents infectieux utilisés seront bioluminescents ce qui nous permettra d'utiliser des systèmes d'imagerie dédiés aux petits animaux pour suivre l'infection.

Un maximum de 1088 souris seront utilisées sur 5 ans (ce nombre minimal d'animaux à inclure pour pouvoir appliquer des tests statistiques pour petits échantillons a été déterminé en collaboration avec des biostatisticiens)

13076 La consommation de viandes et charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les recommandations nutritionnelles actuelles sont d'en limiter la consommation. Des études à l'aide de modèles animaux ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur, et cela serait expliqué par sa capacité à induire une forte dégradation des lipides aboutissant à la formation de molécules toxiques, nommées aldéhydes, qui sont délétères pour les cellules du côlon. Cette consommation riche en fer augmente l'inflammation en induisant une toxicité contre les cellules du côlon. En parallèle, il a été établi que des altérations de la fonction de barrière de l'intestin surviennent lors d'épisodes stressants, chez l'homme et l'animal. L'objectif de cette étude est de regarder si ces effets délétères des aldéhydes (inflammation et toxicité) issus de la consommation de fer sont plus importants chez des souris ayant une barrière épithéliale intestinale altérée par rapport à ceux observés chez une souris présentant une barrière intestinale saine afin de vérifier si l'effet de la consommation de viande peut être aggravé lorsque la muqueuse colique ne remplit plus son rôle de bouclier. Si cela est le cas, ceci devra permettre à terme d'affiner les recommandations nutritionnelles. L'hypothèse est que l'altération de la barrière intestinale augmente d'une part la surface d'épithélium intestinal exposé aux aldéhydes et d'autre part le passage de ces composés toxiques à travers la barrière intestinale, augmentant ainsi les effets délétères des aldéhydes. Pour

vérifier cette hypothèse, nous comparerons l'effet de la consommation de fer dans deux modèles de barrière intestinale altérée (un modèle de barrière intestinale constitutivement altérée (CA-MLCK) et un modèle de stress chronique) à l'effet dans un modèle de souris avec une barrière intestinale saine. Deux études différentes seront donc effectuées et au total, 192 souris (96 souris mâles et 96 souris femelles) seront incluses dans cette étude. L'intérêt de faire ces deux études sur ces 2 modèles de barrière intestinale altérée est de pouvoir vérifier si seule l'augmentation basale de la perméabilité intestinale chez les CA-MLCK suffit à augmenter les effets délétères de l'hème ou si les autres effets liés au stress participent à augmenter ces effets. Il est nécessaire de séparer les mâles des femelles car les effets de la consommation de fer varient en fonction du sexe. Nous étudierons sur ces animaux la capacité de bouclier de la barrière épithéliale intestinale, la réponse inflammatoire et la toxicité au niveau de la muqueuse colique, ainsi que des marqueurs de l'oxydation des lipides dans les fèces. Cette étude sera conduite dans le respect du principe des 3R. Le microbiote intestinal joue un rôle important dans la fonction de barrière intestinale, l'utilisation de modèle animal est donc indispensable pour intégrer l'ensemble des effets au niveau du côlon. Le nombre d'animaux a été défini en fonction de données issues de la littérature (12 souris par groupe), les conditions expérimentales grâce aux points limites et critères d'interruption définis en fonction du poids, et du comportement et l'utilisation de sondes de gavages à bout arrondi, limiteront la douleur et le stress animal. Les souris seront hébergées 2 par cage tout au long de l'étude, dans des locaux d'animalerie conventionnels avec un enrichissement (tunnels) leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Si malgré toutes les mesures prises pour réduire la douleur au minimum pendant les procédures expérimentales, une souffrance est constatée, la procédure sera systématiquement arrêtée. A la fin de la procédure, les souris seront mises à mort et plusieurs prélèvements post-mortem seront effectués afin d'évaluer la génotoxicité de la muqueuse colique et l'expression de gènes impliqués dans la modulation de la perméabilité intestinale, l'inflammation colique et la détoxification.

13077 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie se caractérise sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Ces symptômes ont été associés à une perte de neurones produisant la dopamine au niveau cérébral. Les traitements actuels visant à soulager ces symptômes ne sont pas optimaux. Le développement de nouveaux outils thérapeutiques est donc essentiel. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux de la maladie de parkinson (MP) chez le rat qui permettent de reproduire les symptômes moteurs typiques de cette maladie ainsi que la perte de neurones dopaminergiques et d'évaluer les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins bien décrits dans la littérature. Les modèles que nous utilisons permettent d'évaluer l'effet de composés pharmacologiques sur les composantes comportementales (l'amélioration des symptômes moteurs) et cellulaires (effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques) de la MP chez le rat.

Ces modèles sont générés dans le cadre d'une activité pré-clinique sur des composés thérapeutiques avec un nombre de 3 études par an, comprenant 100 rats par étude (soit un total de 1500 animaux sur 5 ans). Ces modèles sont basés sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire via l'injection intracérébrale soit d'une neurotoxine, la 6-OHDA (lésion totale) soit d'un virus (lésion partielle). Les approches mises en œuvre sont une chirurgie (stéréotaxie) peu douloureuse et l'administration chronique d'un traitement. Le bénéfice attendu est une meilleure compréhension des effets d'un traitement expérimental à différentes doses dans la MP, mesurés grâce à différents tests comportementaux faisant appel au comportement moteur.

Notre activité de recherche pré-clinique nous amène à tester différents composés thérapeutiques sur ce modèle avec 3 études par an, comprenant 100 rats par étude. Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 20 animaux par groupe soit 100 rats par étude incluant les groupes expérimentaux (4 doses différentes de composé) et leur contrôle. L'analyse des effets

pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement par des modèles *in vitro* actuels ne permettrait pas de répondre à notre question. Pour le respect du R de raffiner, les procédures prévues sont légères. Nous avons vérifié par ailleurs qu'aucune donnée actuelle n'indique que les molécules testées soient susceptibles d'entraîner une souffrance chez les animaux. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire.

13078 La plupart des fonctions physiologiques de l'organisme sont rythmées sur 24 heures par le système circadien (du latin, « circa-diem », environ un jour). Les cellules de notre corps contiennent chacune une horloge circadienne moléculaire. Celles-ci sont coordonnées par un pacemaker central situé dans le cerveau. Ce pacemaker est aussi synchronisé par des facteurs externes tels que les cycles de lumière ou d'apport alimentaire. De multiples résultats expérimentaux et cliniques ont montré que la toxicité et l'efficacité de nombreux médicaments anticancéreux varient fortement selon l'heure d'administration sur 24 heures. De plus, le sexe du sujet semble être un facteur essentiel pour déterminer l'heure optimale d'administration. L'objectif de ce projet est d'étudier les rythmes sur 24h de toxicité et d'efficacité des médicaments anticancéreux, en fonction du sexe, afin d'optimiser la chronothérapie des cancers.

Nous nous focalisons sur l'irinotecan et l'oxaliplatine, deux médicaments anticancéreux actuellement utilisés contre les cancers digestifs et responsables de toxicités sévères chez le patient. Le but de cette étude est d'augmenter à la fois la tolérabilité et l'efficacité antitumorale de ces deux médicaments en optimisant, en fonction du sexe du sujet, i) leurs schémas d'administration sur 24h, ii) leurs combinaisons avec d'autres molécules inhibant des protéines impliquées dans leur pharmacologie.

Dans une première phase, nous déterminerons les heures de meilleure et de moindre tolérance des combinaisons médicamenteuses anticancéreuses chez la souris saine. Puis, l'heure de meilleure efficacité antitumorale sera étudiée chez la souris porteuse de tumeurs (cancer du foie, pancréas, ou colon). Enfin, l'effet des médicaments sur l'horloge circadienne de l'hôte et de la tumeur sera investigué. Ainsi, ce projet de 5 ans est structuré en 3 études investiguant : 1. la chronotolérance des médicaments, 2. La chronoefficacité des médicaments, 3. l'effet des médicaments sur le système circadien. Le nombre total de souris est de 4514 animaux. La souffrance des souris sera contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. En cas de douleurs visibles, de perte de poids excessive, ou de taille tumorale dépassant 10% du poids corporel de la souris, l'animal sera euthanasié.

Les expérimentations animales chez la souris sont indispensables pour approfondir la connaissance des mécanismes par lesquels le système circadien contrôle la progression des cancers ainsi que l'activité des traitements. Les expérimentations animales constituent un prérequis indispensable à la mise au point de protocoles d'optimisation de la Chronothérapie chez l'Homme. Leur valeur prédictive a été démontrée en de multiples occasions dans des essais cliniques internationaux randomisés. Pour ces raisons, ce projet nécessite l'utilisation d'approches *in vivo*. Cependant, l'approche pluri-disciplinaire proposée utilise des modèles mathématiques intégrant des résultats *in vitro* sur culture de cellules, *in vivo* chez la souris, et clinique chez le patient cancéreux, dans un souci de remplacement, réduction et raffinement des expériences animales. Les premiers modèles *in vitro- in silico* de chronopharmacologie ont été publiés par notre unité, permettant un remplacement partiel des expériences sur les animaux grâce aux modèles mathématiques. De plus, des tests statistiques sont réalisés afin de déterminer le nombre minimum de souris pour chaque expérience. Enfin, la réduction du nombre d'animaux s'appuie sur les développements

technologiques d'imagerie moléculaire 3D et dynamique dont s'est dotée notre Unité. Ces méthodes permettent le suivi des paramètres scientifiques d'intérêt sur un même animal au cours du temps, remplaçant les protocoles traditionnels nécessitant le sacrifice d'un animal à différents temps d'expérience.

13079 Les cancers sont des maladies dont l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires est encore mal connu. L'approfondissement des connaissances demeure un objectif majeur pour améliorer les différents traitements existants.

L'inflammation est un processus physiologique déclenché par des agressions internes ou externes. La réaction inflammatoire est salutaire dans de nombreux cas mais peut devenir pathologique en cas de chronicité, dans des phases aiguës non contrôlées et dans la progression tumorale. L'inflammation fait intervenir des cellules endothéliales et de nombreux types de cellules sanguines parmi lesquelles les macrophages qui ont un rôle majeur. Elle se caractérise par une phase précoce avec un recrutement d'effecteurs cellulaires (tels que les macrophages/monocytes) et la production de cytokines/chemokines suivie d'une phase tardive appelée « résolution de l'inflammation » correspondant au retour à l'état physiologique basal.

Le projet portant sur l'étude de la physiologie de réactions inflammatoires, il n'est pas possible d'obtenir les réponses en utilisant un modèle cellulaire.

Nous avons créé un modèle rongeur dans lequel un gène, *trim33*, est inactivé dans les macrophages, ce qui empêche la résolution de la réaction inflammatoire et induit un défaut de prolifération des cellules tumorales. Il nous reste à définir, par des études *in vivo*, les défauts cellulaires associés à la perte d'expression de *trim33* dans les macrophages, et les gènes régulés par ce même gène au cours de l'inflammation induite et de la progression tumorale.

L'ensemble de ces recherches permettra de définir les rôles de *trim33* dans la résolution de la réponse inflammatoire et dans la progression tumorale, les domaines et les interactions protéiques impliqués dans ces rôles, et les conséquences fonctionnelles de la perte de ce gène dans les macrophages.

Pour cette étude, nous avons retenu plusieurs modèles de rongeurs, élevés dans notre établissement. Le génotype de ces animaux, connu et maîtrisé par notre équipe, nous permettra de comprendre les mécanismes mis en jeu. Le nombre d'animaux (4868) a été déterminé grâce aux expériences réalisées dans le cadre d'un précédent projet. Il correspond au minimum nécessaire pour assurer la validité des expériences qui seront menées.

L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes. L'application de critères d'arrêts des animaux hébergés en groupe nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie

13080 Le cancer du côlon (CC) est la troisième cause maligne diagnostiquée et la quatrième cause de décès par cancer dans le monde. Jusqu'à récemment, le CC semblait être une maladie homogène. Néanmoins, la caractérisation moléculaire de CC au cours de la dernière décennie a permis de scinder cette maladie apparemment homogène en plusieurs entités. Il a été décrit que la moitié des CC appartiennent à plusieurs sous-types moléculaires (CC « mixtes »). Il est important de noter que le pronostic des cas mixtes semble être dicté par le sous-type moléculaire de plus mauvais pronostic qui sous-tendent l'importance de ces phénotypes mélangés dans l'évolution du cancer.

Nous aimerions aborder, dans le cadre de ce projet, la question de savoir comment les adénocarcinomes colorectaux humains et murins présentant un phénotype « mixte » évoluent *in vivo*, dans un modèle de souris approprié. Nous aimerons également savoir que se passe-t-il lorsque les tumeurs « mixtes » sont sous la pression du système immunitaire, soit dans des circonstances naturelles (sans traitement), soit lorsque la réponse immunitaire anticancéreuse est stimulée par une chimiothérapie immunogène. Ce projet devrait avoir des implications majeures pour la stratification des patients et le développement de stratégies thérapeutiques bien fondées, y compris de traitements de deuxième ligne en fonction de l'apparition de résistances.

Ce projet d'une durée de 5 ans prévoit des expériences de croissances tumorales dans des souris immunocompétentes et immunodéficientes. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Ce projet nécessite l'implication d'animaux vivants car il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *in vitro/ex vivo* du fait de sa complexité. Nous avons choisi le modèle souris car notre projet s'applique à étudier l'implication du système immunitaire dans la lutte anti cancéreuse. La souris est le mammifère le plus utilisé en expérimentation animale (suffisamment petit pour en avoir un certain nombre, facile à manipuler et suffisamment grand pour pouvoir recevoir des injections de cellules tumorales). Le nombre d'animaux par groupe (10) est un compromis entre réduction et nombre d'animaux suffisants pour obtenir des résultats significatifs étant donné la complexité de chaque modèle. Le nombre de groupes proposés inclut les groupes contrôles nécessaires. Les expérimentations seront par ailleurs regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Ce projet nécessitera au maximum 1050 souris. L'étude est divisée en plusieurs procédures et sera arrêtée si une des procédures invalide l'hypothèse de travail ; le nombre de souris sera ainsi diminué. Par ailleurs, une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié et expérimenté sur le plan technique et par ailleurs formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être (maximum 5 souris par cage) et disposeront de coton dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. La surveillance régulière permettra le suivi du comportement (prostration, autoagression, etc) et de la croissance tumorale, afin d'euthanasier les animaux dès qu'ils atteignent un point limite.

13081 Comprendre les origines du langage est un défi en sciences humaines et en biologie évolutive. Si le langage est un attribut humain, une de ses composantes - l'apprentissage vocal - est partagée avec d'autres espèces, dont plus de la moitié des espèces d'oiseaux (oscines). Chez le Diamant Mandarin (*Taeniopygia guttata*), seuls les mâles chantent. Ils apprennent à chanter pendant une période sensible de la vie précoce, comprise entre 25 et 90 jours après l'éclosion. En conditions naturelles, les jeunes apprennent leur chant en imitant principalement le chant de leur père, mais aussi en copiant certaines parties du chant d'autres mâles vivant dans leur environnement proche. En laboratoire, la meilleure façon d'obtenir une copie fidèle du chant consiste à placer un jeune mâle en présence d'un mâle adulte. Cette relation dyadique jeune-adulte constitue ainsi une référence en neuro-éthologie pour explorer les aspects neurobiologiques de l'apprentissage du chant chez les oiseaux. Cependant, cette méthode ne permet pas un contrôle précis des différentes variables impliquées dans l'apprentissage du chant (ex : comportement du tuteur : interactions physiques avec le jeune, nombre de chants quotidiens produits...) Au cours de ce projet, nous proposons d'utiliser la robotique comme méthodologie expérimentale afin d'explorer les aspects multimodaux de l'apprentissage du chant chez le Diamant Mandarin. Nous utiliserons ainsi un robot-oiseau comme tuteur de chant afin d'étudier l'importance de ces différents facteurs et notamment de l'interaction vocale et physique dans l'apprentissage du chant.

Au cours d'une autre expérience, nous allons également tester la préférence d'oiseaux (jeunes et adultes, mâles et femelles) pour un robot par rapport à d'autres stimuli.

Pour ce projet, nous avons développé une boucle d'interactions vocales oiseau-machine. Nous proposons d'utiliser cette boucle d'interactions vocales dans un autre contexte : celui de la communication vocale entre partenaires sexuels. Si le chant est appris, il existe dans le répertoire vocal du Diamant Mandarin une dizaine de cris produits par les deux sexes dans différents contextes socio-sexuels. La plupart de ces cris sont des signatures vocales qui permettent une reconnaissance individuelle de l'émetteur. Des travaux récents ont montré que les interactions vocales sont déterminantes dans la formation et le maintien des couples chez cette espèce. A l'aide de la boucle d'interactions vocales, nous simulerons des situations d'échanges vocaux entre un oiseau et 1) son partenaire sexuel ; 2) un autre individu du même sexe que le partenaire sexuel ; 3)

un bip sonore, au cours de 2 situations : a) en boucle fermée (réponse contingente aux cris produits par l'oiseau testé) et b) en boucle ouverte (réponse non contingente selon un intervalle de temps fixe ou aléatoire).

Remplacement : cette expérience a pour but de mesurer l'influence des interactions sociales et plus précisément vocales dans la formation et le maintien d'une relation dyadique entre 1) un jeune oiseau et un tuteur de chant ; 2) deux partenaires sexuels. Le Diamant Mandarin est le modèle biologique le plus utilisé pour la recherche sur le chant des oiseaux. Ce petit animal domestique est facile à élever en captivité. Aucune autre espèce animale capable d'apprentissage vocal ne se prête mieux à ce type d'étude.

Réduction: afin de garantir un traitement statistique correct des données, 36 jeunes mâles et 12 mâles adultes (âgés de plus de 120 jours) seront utilisés pour la première procédure expérimentale : 1) douze testés avec un tuteur robot-oiseau (interactif) ; 2) douze testés avec un tuteur robot-oiseau (non interactif) ; 3) douze testés avec un tuteur mâle adulte. Pour la deuxième procédure expérimentale, nous utiliserons 12 mâles adultes (âge>120 jours), 12 jeunes mâles (âge : 25-35 jours), 12 femelles adultes (âge>120 jours), 12 jeunes femelles (âge : 25-35 jours). Seize adultes (huit mâles et huit femelles) seront utilisés pour la troisième procédure expérimentale. Au total, nous utiliserons 112 individus.

Raffinement : différentes mesures seront prises pour réduire le stress au cours de nos expériences. Pour la première procédure expérimentale, les jeunes oiseaux resteront avec leur mère du jour 15 au jour 35 après l'éclosion. Durant cette période, les jeunes seront régulièrement manipulés par un expérimentateur humain afin d'être habitués aux contacts nécessaires durant le reste de l'expérience. Durant l'expérience (du jour 35 au jour 90), les jeunes seront placés en isolement social mais seront exposés 5 jours par semaine à un robot-oiseau et une fois par semaine à la vidéo d'une femelle. Un miroir sera également placé dans la cage. Pour la deuxième procédure expérimentale, les oiseaux seront habitués en groupe dans l'arène utilisée pour mesurer leur préférence avant d'être testés individuellement lors des phases de choix. Pendant cette phase, l'activité vocale de leur colonie d'origine sera diffusée afin de limiter le stress de l'isolement social. Pour la troisième procédure expérimentale, les couples seront hébergés ensemble dans un caisson d'enregistrement et séparés uniquement durant le test (20 min par jour pour chaque oiseau). A la fin des expériences, les oiseaux ne seront pas euthanasiés.

13082 L'hémorragie sous arachnoïdienne (HSA) par rupture d'anévrisme intra crânien, correspond à la présence de sang autour du cerveau, et entraîne fréquemment un décès ou un handicap. C'est une pathologie trois fois plus fréquente chez la femme que l'homme. Une des complications des HSA est l'hydrocéphalie, correspondant à une accumulation de liquide céphalo-spinal (LCS) dans le crâne. Le LCS est présent en conditions normales dans le cerveau, il est sécrété puis réabsorbé. S'il s'accumule et qu'il n'est pas traité rapidement, il comprime le cerveau et entraîne le décès. Cela impose la mise en place d'une dérivation du liquide par un drain vers l'extérieur du crâne. Il s'agit d'un traitement chirurgical invasif. Il n'y a pas à l'heure actuelle de traitement médical de cette accumulation de liquide. Cette dernière a longtemps été attribuée à un défaut de réabsorption, la littérature actuelle montre qu'il s'agirait plutôt d'un excès de sa sécrétion. Ce phénomène peut être contrôlé par l'administration d'un médicament, le Bumétanide®. Nous souhaitons donc évaluer le rôle de l'hypersécrétion du liquide du cerveau dans l'hémorragie méningée, puis l'intérêt d'un traitement par Bumétanide ® dans un modèle murin d'HSA.

Nous réaliserons des HSA par perforation vasculaire chez des rats Wistar femelles adultes (9-10 semaines), sous anesthésie générale et analgésie adaptée. Nous réaliserons le suivi de l'hydrocéphalie par IRM puis évaluerons ensuite l'effet du Bumétanide.

Cette étude prend en compte le bien-être des animaux et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Cette étude ne peut être réalisée à l'aide de méthode de substitution. Le maximum sera mis en œuvre afin de réduire le stress et la douleur ressentis par animaux. De ce fait, toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale associé à une couverture analgésique adaptée. Afin de réduire le nombre d'animaux pour cette étude, le nombre de rats nécessaire en vue d'atteindre la significativité a été déterminé au moyen

d'analyse de puissance statistique se basant sur les données de la littérature De plus, des examens d'imagerie non invasifs comme l'IRM seront privilégiés. Ainsi, en appliquant aux mieux la règle des 3Rs, le nombre total d'animaux pour ce projet est de 544 rats.

Enfin, le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé, 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Ils seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les personnes conduisant les expériences sont formées et expérimentées.

Mots clefs : Accident Vasculaire Cérébral, hémorragie sous arachnoïdienne ; Plexus choroïdes ; Hydrocéphalie ; Liquide cérébro-spinal ; Bumétanide ® ; système glymphatique

13083 De nombreux facteurs peuvent perturber le microbiote intestinal : les infections, le régime alimentaire ou les médicaments et l'alcool. Cette altération du microbiote, ou dysbiose, peut entraîner la perte de certaines fonctions de l'intestin (digestion des aliments, absorption des nutriments, péristaltisme, évacuation des déchets) et participer à différentes pathologies comme l'obésité ou des maladies inflammatoires chroniques intestinales.

Les probiotiques sont des microorganismes vivants exerçant un effet bénéfique sur l'organisme qui les ingère, et ils pourraient être utiles dans la prévention et/ou le traitement des dysbioses. Le nombre des traitements médicamenteux augmentent régulièrement depuis des années, et ils ont un impact notable sur le microbiote intestinal entraînant des dysbioses. Dans une étude européenne réalisée en 2014, il a été montré que 48% de la population a pris des médicaments pendant au moins 2 semaines. Le microbiote joue un rôle clé dans la santé chez l'homme via des associations à de nombreuses pathologies, et il peut être sévèrement altéré par certains traitements. De même, une consommation excessive d'alcool est corrélée à une dysbiose du microbiote et des troubles neuropsychiques. Dans cette étude chez la souris, une consommation d'alcool pendant 3 semaines entraîne une dysbiose et des comportements anxieux/dépressifs. Les effets bénéfiques des probiotiques pourraient protéger et/ou restaurer le microbiote en faisant intervenir des mécanismes complexes qui agissent entre autre sur le rééquilibrage du microbiote intestinal et colique.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet de traitements probiotiques sur des dysbioses intestinales et/ou coliques induites expérimentalement chez le rongeur (rat, souris ou hamster). Dans ce projet nous nous intéresserons aux dysbioses médicamenteuses (inhibiteurs de pompes à protons, protecteurs de l'estomac, antibiotiques non critiques, ...) et à la dysbiose induite par la prise d'alcool. La dysbiose sera caractérisée par plusieurs paramètres : évolution du poids corporel, présence de signes diarrhéiques et analyse du microbiote.

Les modèles sur cultures de cellules ne permettent pas d'étudier dans leur ensemble les perturbations du microbiote induites par les médicaments ou l'alcool. Des études sur des modèles animaux reproduisant la pathologie sont nécessaires pour déterminer les effets de nouveaux traitements potentiels.

Les traitements par des préparations de probiotiques seront administrés par voie orale, selon un mode curatif ou un mode préventif, c'est-à-dire avant ou pendant l'induction de la dysbiose. En cas d'intolérance au produit, les traitements des autres animaux ne seront pas réalisés.

Le nombre d'animaux utilisés est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire 10 animaux par groupe.

Au maximum, 9600 animaux seront utilisés pour la durée maximale du projet (5 ans). Ce nombre se décompose de la manière suivante :

10 animaux x 4 groupes x 5 molécules induisant la dysbiose x 4 préparations de probiotiques x 2 cinétiques de traitements probiotiques x 3 espèces (rats, souris ou hamster) x 2 genres = 9600 animaux. Soit 3200 animaux au maximum par espèce.

Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté (tunnel, coton, sizzle dry). Un suivi quotidien de leur bien-être, dès

leur arrivée, et l'application de points limites au cours des traitements sont réalisés pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Durant la procédure, des prélèvements sanguins des animaux se feront sous anesthésie afin de réduire l'inconfort et le stress des animaux. Les animaux seront placés sur des tapis chauffants lors de l'anesthésie pour éviter une hypothermie.

13084 Chez l'animal comme chez l'homme, le choc septique entraîne des modifications importantes de la réponse immunitaire susceptibles de favoriser le risque d'infection secondaire et de décès. Des résultats récents décrivent l'augmentation chez les souris et les patients septiques d'une population de cellules du système immunitaire (les plasmocytes) qui pourraient participer à ces modifications et donc représenter une cible thérapeutique potentielle dans la prévention des infections nosocomiales en réanimation.

L'objectif de l'étude est de confirmer *in vivo* le rôle de ces cellules dans le développement des altérations immunitaires induites par le sepsis dans un modèle de sepsis expérimental. Ceci sera abordé grâce à des expériences de déplétion de ces cellules. Le sepsis sera induit par la procédure de ligature et ponction caecale (CLP). La déplétion des cellules sera réalisée par injection de traitements ciblant ces cellules un jour après la chirurgie.

Lors d'une première série d'expériences, nous évaluerons 2 traitements différents qui éliminent les plasmocytes afin de sélectionner le traitement le plus efficace, le plus spécifique et le mieux toléré ainsi que sa dose.

Dans une deuxième série d'expériences, un nombre suffisant de souris septiques recevra ce traitement. L'effet de la déplétion des plasmocytes sur la réponse immunitaire sera évalué. Les résultats obtenus chez les souris septiques recevant ce traitement seront comparés avec ceux obtenus chez des souris septiques non traitées et des souris non septiques traitées ou non (4 groupes de souris). La réponse immunitaire sera évaluée dans ces 4 groupes par un panel de tests réalisés au laboratoire en parallèle sur les organes prélevés après mise à mort dans les différents groupes afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Lors de la procédure chirurgicale de CLP, la prise en charge de la douleur sera réalisée grâce à une anesthésie générale et locale au niveau du site opératoire en suivant les bonnes pratiques de chirurgie et grâce à un traitement analgésique mis en place avant l'induction de l'anesthésie et poursuivi pendant 2 jours après l'intervention. Lors de l'intervention les animaux seront placés sur un tapis chauffant afin de limiter au maximum l'hypothermie peropératoire. Un traitement antibiotique sera mis en place 6h après la chirurgie et maintenu pendant 2 jours. Enfin, une injection de solution saline sera également administrée aux souris à l'issue de la chirurgie afin d'éviter la déshydratation.

Le bien-être des souris à l'issue de la chirurgie sera favorisé grâce au placement de la cage sur tapis chauffant en présence d'aliments humides et d'une litière de cellulose. Une surveillance des symptômes sera réalisée jusqu'à mise à mort des souris à J+2 après la chirurgie. Un point limite sera défini au-delà duquel les souris seront mises à mort afin de limiter au maximum leurs souffrances.

Afin de minimiser le nombre d'animaux inclus, un calcul du nombre de souris par groupe a été réalisé. Considérant l'ensemble des conditions présentées dans le protocole, 78 souris sont nécessaires.

Les résultats obtenus dans cette étude nous permettront de démontrer le rôle des plasmocytes induits après le sepsis dans le développement des altérations immunitaires après un choc septique.

13085 En 2019, la recherche nécessite toujours l'utilisation de modèles animaux pour la fiabilité des résultats de recherche et l'application en essai clinique de nouvelles molécules. La Directive 2010/63/UE pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques régit l'utilisation des animaux dans ce cadre et garantit le respect de l'animal dans les projets d'enseignement et de recherche. La réglementation française impose que les responsables de projets suivent

préalablement à toute activité expérimentale une formation réglementaire dont le contenu est défini par arrêté ; cette formation doit inclure des travaux pratiques sur animal vivant.

Les rongeurs représentent 68% des animaux utilisés en recherche en France en 2018. Il est donc important et pertinent de proposer des formations à la manipulation des souris et des rats. Les travaux pratiques ont pour objectif de sensibiliser les futurs concepteurs et de les former à la manipulation des souris et des rats dans le respect de l'animal, mais aussi de leur apprendre les bons gestes techniques. Cela permet à terme de garantir leur bonne exécution en situation professionnelle et contribue ainsi au respect du bien-être animal. Les différentes techniques et voies d'injection/prélèvement, seront rappelées. Les gestes et voies d'injection les mieux adaptés seront précisés en fonction de la condition expérimentale. Seuls des gestes de base (couramment utilisés) et faiblement invasifs seront enseignés (injection sous cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse et intramusculaire).

Les formations seront précédées d'un enseignement théorique, d'un rappel et d'une démonstration par le formateur. Enfin la réalisation des gestes sera supervisée par le formateur compétent.

Les principes de remplacement, de réduction et de raffinement ont guidé la définition du programme de ces travaux pratiques :

-Dans le cadre de cette règle des 3R, la notion de remplacement n'est pas possible lors de ces séances de travaux pratiques. En effet les formations avec l'utilisation uniquement d'animaux factices ne sont pas approuvées par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Il est donc nécessaire de recourir à l'utilisation d'animaux pour ces enseignements ; par ailleurs, la formation en condition réelle permet un meilleur apprentissage.

-Le nombre d'animaux utilisés pour ses séances a été réduit au maximum tout en veillant à garantir la qualité pédagogique des travaux pratiques et le bien-être des animaux utilisés. En effet, nous n'utiliserons qu'une seule souris par stagiaire, et un rat pour deux stagiaires. Chaque formation nécessitera 20 souris et 10 rats. Ce projet de 5 ans compte 4 formations annuelles, donc 400 souris et 200 rats seront utilisés au total. Par ailleurs, nous aurons recours autant que possible à des animaux de réforme, non utilisables dans le cadre de la recherche et destinés à être euthanasiés. Ceci participe à la réduction globale des animaux utilisés dans le cadre de la recherche et l'enseignement.

-Raffinement : les animaux utilisés le seront pour des durées de TP de 4h, et pour un usage unique. De plus les gestes pratiqués seront peu invasifs. Les rongeurs sont auparavant hébergés en groupes sociaux, ils bénéficient d'enrichissement du milieu et d'une période d'acclimatation. Tous les gestes seront encadrés par les formateurs et les points limites sont définis ; en cas de stress et/ou souffrance trop importants, l'euthanasie de l'animal sera mise en oeuvre pour interrompre sa souffrance. Les séances de TP seront encadrées par quatre formateurs expérimentés, se répartissant les stagiaires en petit groupe.

13086 Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent et la quatrième cause de décès par cancer chez l'Homme. Les cancers colorectaux sporadiques représentent 95% des cas. Aussi, on considère qu'environ 80% des causes de CCR sont liées à des facteurs environnementaux, le reste étant dû à des facteurs génétiques familiaux.

Le microbiote intestinal, qui regroupe l'ensemble des microorganismes présents dans le tractus digestif est un élément essentiel de l'environnement colique et les interactions entre microbiote et cancer colorectal font l'objet d'un intérêt croissant. Les *Escherichia coli* sont des bactéries du microbiote suspectées de jouer un rôle dans le CCR. *Escherichia coli* est une bactérie commensale mais suite à l'acquisition de facteurs de virulences, elle peut devenir responsable d'infections intestinales ou extra-intestinales (diarrhées, infections urinaires, méningites...). Parmi les facteurs de virulences portés par *E. coli*, certains sont capables d'agir directement sur le cycle cellulaire eucaryote. C'est le cas notamment de la toxine colibactine dont la synthèse est assurée par un îlot génomique : l'îlot pks. Les *E. coli* producteurs de colibactine (*E. coli* pks) induisent notamment des cassures de l'ADN et sont retrouvés préférentiellement au contact de la muqueuse lésée des patients souffrant d'un CCR comparativement à la muqueuse saine (50-60% vs 20%

respectivement). Enfin, bien que les E. coli pks soient incapables à eux seuls d'induire un CCR chez la souris, la colonisation du tractus gastro-intestinal d'animaux prédisposés à développer un cancer colorectal par ces bactéries, se traduit par l'augmentation du nombre de tumeurs. Tous ces résultats sont en faveur d'un rôle des E. coli pks dans le développement du CCR. Malheureusement, les mécanismes impliqués restent largement inconnus.

Nous souhaitons étudier *in vivo* l'impact de l'infection par des E. coli pks sur le CCR dans un modèle murin. Pour cela, des souris mâles sauvages C57BL/6 âgées de 6 semaines rendues susceptibles au CCR seront colonisées par une souche E. coli pks ou par une souche de E. coli dont l'îlot pks a été inactivé. Elles seront ensuite sacrifiées, les tumeurs collectées et analysées. Nous chercherons notamment à caractériser les marqueurs de surface exprimés par les cellules épithéliales cancéreuses infectées par E. coli pks ainsi qu'à évaluer leur capacité de résistance aux drogues de chimiothérapie.

Dans le cadre de la règle des 3R et afin de limiter le nombre d'animaux, un maximum de tumeurs sera collecté. De plus, les animaux seront observés tous les jours et pesés une fois par semaine afin de nous assurer de leur bien-être. Au moindre signe de stress/douleur, l'animal en question sera isolé et du paracétamol lui sera administré par gavage de manière à nous en assurer de sa prise (100 mg/kg). Si une perte de poids supérieure ou égale à 10% du poids total de l'animal est observée, l'animal sera euthanasié. Enfin, si un comportement anormal (vocalise, prostration...) était repéré, l'animal serait immédiatement euthanasié.

L'enrichissement du milieu est également prévu avec l'ajout de maisonnette à l'intérieur des cages. 40 souris seront utilisées dans ce projet.

13087 L'acrodysostose correspond à un syndrome de dysplasie squelettique rare caractérisé par une très petite taille, des malformations osseuses des mains et des pieds (brachydactylie sévère), une dysostose faciale avec hypoplasie nasale et un retard mental de sévérité variable. Une maturation squelettique avancée et une obésité sont fréquemment associées. Une résistance hormonale est également associée (notamment une résistance à la PTH et à la TSH).

L'acrodysostose est due à des mutations du gène PRKAR1A qui code pour la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (PKA). La PKA est une protéine clé de la voie des récepteurs transmembranaires couplées aux G protéines. Cette protéine est exprimée dans de nombreux tissus. Les mutations du gène PRKAR1A diminuent l'activité de la PKA.

Le but de notre projet est de développer une approche par thérapie génique pour traiter les hommes et les femmes hétérozygotes atteints d'acrodysostose. Nous disposons au laboratoire d'un modèle de souris génétiquement modifiée porteuse de la mutation récurrente. Cette souris reproduit les caractéristiques de la pathologie humaine : dysplasie osseuse et résistance hormonale. La stratégie abordée est d'exprimer le gène PRKAR1A non modifié en injectant un vecteur dérivé des virus adéno-associés (AAV) aux souris mutées. L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que des mesures de la taille, la longueur des os et des tests comportementaux. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales seront mis en place selon la procédure. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet (505 souris) sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet thérapeutique du traitement.

Moyens mis en œuvre pour satisfaire aux exigences de remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement : Pour réaliser ce projet, l'utilisation d'un modèle murin est indispensable, car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne nous permettra d'étudier l'effet thérapeutique du vecteur injecté à l'échelle de l'organisme entier. Nous disposons au laboratoire d'un modèle de souris génétiquement modifiée porteuse de la mutation récurrente reproduisant les caractéristiques de la maladie humaine.

Réduction : La constitution des groupes est basée sur notre expérience et le type d'analyses réalisées, et permettra d'obtenir des données statistiquement significatives permettant d'évaluer l'effet thérapeutique du traitement et de sa toxicité potentielle.

Raffinement : Des protocoles anesthésiques et d'analgésie adaptés seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale se déroulera sous anesthésie générale.

13088 Dans le but d'assurer une traçabilité complète de l'apprentissage des gestes techniques réalisés sur des animaux de réforme, le présent projet va décrire certaines méthodologies des gestes techniques. Le training des gestes techniques se fera sur des souris destinées à être euthanasiées car ne portant pas les gènes d'intérêts. L'apprentissage se fera par encadrement d'une personne compétente et formée. Nous enregistrerons les animaux destinés à ce projet de training pour des étudiants, des ITA ou le personnel permanent souhaitant se former et s'entraîner sur les souris.

Dans ce projet, nous utiliserons des mâles et des femelles à des âges variés. Nous utiliserons les animaux disponibles ne pouvant pas rentrer dans un projet de recherche. Toutes les injections se feront avec des solutions injectables type NaCl (0,9 pour mille). Les volumes de prélèvements de sang seront effectués selon le poids de l'animal aux fréquences respectant sa physiologie.

Gestes techniques réalisés :

- injection intrapéritonéale
- injection sous-cutanée
- injection intra-veineuse (veines caudale et rétro-orbitaire)
- prélèvements de sang au sinus rétro-orbitaire
- prélèvement de sang mandibulaire
- prélèvement de sang à la veine caudale
- prélèvement d'organes (terminal)
- administration sur animal vigile (gavage)

Ce projet va nécessiter sur 5 ans, la réutilisation de 1 600 animaux (soit 200 animaux par gestes techniques). La fréquence de ces gestes sera réalisée en fonction des besoins des utilisateurs. Ce projet s'inscrit pleinement dans la règle des 3Rs :

- la réduction s'observe par une réutilisation des animaux produits n'étant pas considérés comme d'intérêt et n'ayant pas de phénotype dommageable.
- le raffinement sera la conclusion de la formation et permettra diminuer les biais dans les protocoles expérimentaux. Le manque d'adaptation engendre une mauvaise manipulation provoquant un stress ou une douleur.
- le remplacement ne peut pas s'effectuer car il est nécessaire de pouvoir s'entraîner sur ces animaux avant de réaliser le projet *in vivo* souhaité.

Le suivi du bien-être animal sera effectué quotidiennement par un personnel compétent. Les animaux sont pris en charge dès leur entrée dans le service par la Structure du Bien-Etre Animal et au quotidien pour identifier tout signe clinique tels que la prostration, l'agressivité ou la douleur.

13089 -Contexte : L'autophagie est un processus homéostatique essentiel contrôlé par plusieurs fonctions de trafic membranaire toutes coordonnées par des facteurs externes, comme la carence nutritive, le stress oxydatif ou la détection de pathogènes. Cette fonction centrale à la maintenance du métabolisme cellulaire semble aussi jouer un rôle très important dans un nombre de fonctions spécialisées dans des cellules ou tissus particuliers.

-Objectif scientifique : Nous étudierons les conséquences de l'autophagie et de sa régulation sur la présentation antigénique et la production de cytokines par la mise en place de cultures de lignées cellulaires humaines et murines dans le but de remplacer le modèle animal. La capacité de l'autophagie à être contrôlée dans les cellules immunitaires par la détection de produits microbiens et l'exposition à certaines cytokines sera au centre de notre projet. Ainsi, l'utilisation de cellules

primaires murines (rate, moelle osseuse) sera nécessaire pour valider nos observations et démontrer l'importance des molécules étudiées *in vivo*.

PROCEDURE 1. La préparation de cellules dérivées de moelle osseuse ou de rate de souris nous permettra de tester le rôle de nos molécules d'intérêt dans l'autophagie.

PROCEDURE 2. Le transfert de lymphocytes T spécifiques de l'ovalbumine a pour but de tester le rôle de ces molécules dans l'autophagie et les voies associées telles que la présentation antigénique.

PROCEDURE 3. L'infection des souris par Bordetella pertussis déterminerait l'importance de ces modulateurs de l'autophagie pendant une infection.

-Retombées attendues : Nous proposons d'identifier et de caractériser la fonction de nouveaux modulateurs spécialisés de l'autophagie ainsi que de leurs partenaires encore inconnus. En effet, ces modulateurs augmenteraient le flux autophagique probablement en stimulant la formation des autophagosomes et favorisant leur fusion avec les lysosomes. Ainsi, nous déterminerions de manière détaillée le rôle mécanistique de ces molécules dans l'autophagie afin de savoir si elles pourraient aussi affecter l'homéostasie des mitochondries (mitophagie) ou du réticulum endoplasmique (ER-phagie) dans les cellules immunitaires.

-Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : Le rôle de l'autophagie et de ces molécules associées devra être testé dans des modèles animaux pertinents, pour déterminer leur importance réelle pour la physiopathologie d'organismes entiers. Nous utiliserons alors des modèles murins génétiquement délétés pour ces molécules afin d'appréhender leur rôle dans la fonction l'autophagie *in vivo*.

REMPACEMENT : Une grande partie de cette étude sera menée *in vitro* sur des lignées cellulaires immortalisées. Toutefois, il est nécessaire de confirmer les résultats de cette étude avec des cellules primaires obtenues à partir d'animaux ou de tester nos observations au niveau de l'organisme entier *in vivo* (souris) afin de se rapprocher des conditions physiologiques réelles et potentiellement pouvoir effectuer un transfert clinique chez l'homme.

REDUCTION : La réduction du nombre d'animaux est possible principalement par la méthode du « competitive index » (cf. 3. 3. 5). Le nombre d'animaux utilisé sera également réduit grâce à la mutualisation des techniques et analyses sur un même animal.

RAFFINEMENT : La mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel ainsi que le suivi quotidien de l'état de santé des animaux permettront le raffinement de ce projet.

Dès lors qu'un animal aura atteint un point limite énoncé dans le 3. 4. 13, la souris sera euthanasiée dans le but de réduire toute douleur, souffrance et angoisse des animaux. De plus, dans la Procédure 1, aucune intervention aura lieu *in vivo* et le sacrifice aura lieu par dislocation cervicale ce qui réduit notablement toute douleur, souffrance et angoisse des animaux.

Un nombre total de 766 souris C57BL/6 N sera utilisé lors de ce projet.

13090 La radiothérapie est un traitement locorégional qui consiste à utiliser les radiations ionisantes pour détruire les cellules cancéreuses. Les dommages induits par les rayonnements vont bloquer la prolifération cellulaire, tout en préservant le plus possible les zones périphériques saines. Elle est utilisée seule ou en combinaison avec la chirurgie et/ou la chimiothérapie et concerne aujourd'hui 50 à 70% des traitements contre le cancer.

La cryothérapie est une nouvelle technique dans le traitement de certains cancers. La cryothérapie ou cryoablation consiste à créer des lésions tissulaires par hypothermie sévère focalisée. Elle induit non seulement la destruction de la tumeur mais également une apoptose cellulaire.

Une immunothérapie à base d'anticorps est un traitement ciblé permettant de stimuler les défenses immunitaires contre les cellules tumorales.

Le glioblastome est une tumeur cérébrale maligne primitive. Son traitement repose sur la chirurgie d'exérèse si possible, associée à un traitement associant une chimiothérapie et une radiothérapie. Sa récurrence, inéluctable, est traitée par une deuxième ligne de chimiothérapie. Son pronostic reste néanmoins très sombre avec une médiane de survie variant de 8 à 15 mois.

Le but de ce projet est d'évaluer l'effet de la cryothérapie sur le glioblastome et sa capacité à potentialiser l'effet de la radiothérapie et/ou de l'immunothérapie. Une première partie de l'étude consistera à évaluer l'efficacité des différents traitements sur la croissance tumorale. Dans une seconde partie, nous évaluerons l'effet des traitements sur la réponse immunitaire antitumorale.

Au total, 1248 souris seront nécessaires afin d'obtenir des résultats fiables, tout en respectant la règle des 3Rs :

Remplacement : A ce stade de nos connaissances, seule une étude *in vivo* sur des modèles animaux de développement tumoral permettra d'analyser l'effet de la cryothérapie seule et combinée à la radiothérapie sur la réponse immunitaire.

Réduction : Les effectifs sont justifiés par l'importante variabilité des résultats obtenus sur l'étude du système immunitaire dans l'efficacité du traitement pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de paramètres mesurés par animal a été optimisé et nous avons privilégié les études longitudinales.

Raffinement : Toutes les manipulations susceptibles de générer de l'inconfort ou de la douleur (injections, irradiation, cryoablation) seront réalisées sous anesthésie générale. Les souris seront observées quotidiennement et la croissance des tumeurs sera mesurée trois fois par semaine. Les données seront intégrées à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc) et l'animal pris en charge selon le score obtenu (traitement contre la douleur si nécessaire), avec mise à mort dès lors qu'un point limite sera atteint. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces afin d'éviter toute souffrance des animaux. Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'hébergement et d'enrichissement de leur environnement conformes à la validation de la cellule bien-être.

Une étude préliminaire, avec un nombre restreint de groupes conditionnera la suite du projet, le nombre d'animaux annoncé est donc un nombre maximum

Les résultats finaux obtenus permettront de connaître la place de la cryothérapie dans l'arsenal thérapeutique actuel des glioblastomes. L'analyse de la réaction immunitaire à la cryothérapie permettra de mieux appréhender le mécanisme d'action et l'effet de la cryothérapie sur les cellules tumorales.

13091 Le chirurgien maxillo-facial est souvent confronté à la difficile tâche de la reconstruction de l'oreille externe, dans le cas d'anomalie congénitale ou lors de pertes de substances plus ou moins étendues lors de traumatismes ou de cancers. Trois techniques chirurgicales sont actuellement utilisées : l'otopoièse ou reconstruction à partir de côtes flottantes, la mise en place d'implant synthétique sous cutané ou encore le port d'une épithèse implanto-portée. Cependant ces techniques présentent toutes des inconvénients et c'est pour cela que se multiplient des modèles d'otopoièse développés grâce à l'apport de l'ingénierie tissulaire de cartilage.

Dans ce contexte, une approche d'ingénierie tissulaire *in vitro* consiste à utiliser partir d'un biomatériau composé de cartilage décellularisé d'oreille de porc et d'alginate. Ce biomatériau est le support de la multiplication de cellules souches mésenchymateuses et la différenciation de celles-ci en chondrocytes. Le fait de décellulariser le cartilage permet en outre de supprimer toutes cellules et donc toutes réactions immunitaires lors d'une xéno greffe tout en conservant la matrice et donc l'environnement permettant la chondrogénèse. Plusieurs articles ont déjà démontré l'efficacité du cartilage décellularisé dans la chondrogénèse. Pour cela, il faut que la décellularisation soit de qualité. Et pour que celle-ci le soit, il faut faire disparaître la grande majorité de l'ADN et des noyaux cellulaires qui sont responsables de réaction immunitaire à type de rejet. Les standards reconnus dans la littérature sont : une quantité d'ADN inférieure à 50ng par mg de tissu sec, et une absence de noyaux cellulaires.

La décellularisation enzymatique en 4 étapes que nous avons mise au point au sein du laboratoire et les analyses associées donnent de bons résultats correspondant aux différents critères énumérés ci-dessus. Ce qui signifie que nous avons une décellularisation satisfaisante et notre cartilage décellularisé peut ainsi servir de biomatériau pour la chondrogenèse. En vue de la confection de ce

biomatériau, nous transformons ensuite le cartilage décellularisé en poudre et nous l'incorporons à de l'alginate ce qui permet d'obtenir un biomatériau malléable. Dans celui-ci, nous ajoutons dans un second temps les cellules souches mésenchymateuses de manière homogène.

L'objectif de ce travail est d'étudier la réaction immunitaire chez la souris immunocompétente lors de la mise en place d'un biomatériau « cartilage décellularisé de porc – alginate ». On étudiera pour cela, la réaction immunitaire autour du greffon seul ou associé à des cellules, en fonction de la durée d'incubation *in vivo*. Dès lors, aucune étude *in vitro* ne peut se substituer à l'expérimentation *in vivo* pour l'évaluation de la réponse immunitaire de l'hôte. La souris est l'animal approprié pour ce genre d'étude.

Cinq (5) conditions seront testées : 1) Alginate seul, 2) cartilage décellularisé seul, 3) Alginate + cartilage décellularisé, 4) cartilage non décellularisé et 5) le contrôle de chirurgie (sham). Ainsi, nous estimons à 30, le nombre de souris nécessaires à l'étude, soit 5 lots de 6 souris.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, l'état de chaque souris sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. L'animal sera immédiatement soigné s'il présente des blessures légères. En revanche si un animal montrait des signes cliniques de souffrance (perte de poids >20% du poids initial, apathie...), celui-ci serait immédiatement retiré du protocole d'après le point limite décrit pour le projet.

13092 L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une croissance alarmante. La production de glucose par l'intestin est une fonction bénéfique pour l'équilibre glycémique, qui, via un relais nerveux, contrôle les fonctions de l'hypothalamus. Chez l'adulte, l'induction de cette fonction protège de l'obésité et du diabète induit par un régime riche en graisses et en sucres. A l'inverse la production de glucose par le foie favorise le développement du diabète de type 2. Nous avons récemment identifié dans le foie une voie de production de glucose impliquant des vésicules contrôlées par la Cavéoline 1.

L'objectif de ce projet est de déterminer quel est le rôle physiologique de la voie de production de glucose dépendant de Cav1, en distinguant le rôle du foie de celui de l'intestin.

Les modèles utilisés dans ce projet seront constitués d'une invalidation du gène codant pour la Cavéoline-1 (Cav1) dans le foie ou dans l'intestin. Ces modèles ne présenteront pas le phénotype dommageable lié au métabolisme du tissu adipeux observé dans le modèle d'invalidation totale. Nous avons montré qu'une diminution de production de glucose dans le foie ou l'intestin n'induisait pas de phénotype dommageable. Le métabolisme glucidique et énergétique sera mesuré *in vivo*, comme chez l'homme, par un suivi de poids, prise alimentaire et différents tests physiologiques (tests de tolérance au glucose et à l'insuline, clamps).

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement : Les études épidémiologiques montrent que la production hépatique de glucose exerce un contrôle de l'équilibre glycémique en modulant le fonctionnement de plusieurs organes. La production intestinale de glucose contrôle l'équilibre glycémique par un relais nerveux impliquant le cerveau. Comprendre comment les mécanismes cellulaires responsables de la production de glucose hépatique et intestinale impactent la physiologie de l'organisme nécessite de conserver les communications inter-organes. Les études de ce projet qui répondent à cette question seront réalisées *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques.

Raffinement : Les souris seront élevées et hébergées par groupe en environnement enrichi et contrôlé avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux seront manipulés régulièrement, observés quotidiennement et pesés toutes les semaines pour suivre leur prise de poids. Les souriceaux ne seront pesés qu'à partir de la première semaine. La connaissance du modèle animal permet de définir des points limites. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation. La procédure d'isolation des hépatocytes sera réalisée sous anesthésie avec un prétraitement analgésique des animaux, sans réveil des animaux.

Réduction: Nous avons validé la preuve de concept dans un protocole précédent. Le nombre d'animaux maximum utilisé a été estimé à 699 souris sur une période de 3 ans.

Ces résultats permettront de caractériser le rôle d'une nouvelle voie de production de glucose dans le maintien de l'homéostasie glucidique et énergétique. Ces résultats permettront de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le diabète de type 2.

13093 Le cancer du poumon en France se situe au 1er rang des décès par cancer chez l'homme et au 2ème rang chez la femme), avec une incidence de 50 000 cas par an. Le pronostic du cancer du poumon reste sombre avec une survie à 5 ans de 15 % tous stades confondus. L'ablation d'une partie du poumon (pneumectomie) constitue la pierre angulaire du traitement curatif dans ce type de cancer. L'intervention chirurgicale est lourde, associée à une morbidité et une mortalité péri-opératoire importante. L'hypertension pulmonaire est une complication fréquente après pneumonectomie, à l'origine d'une dysfonction cardiaque droite d'arythmie cardiaque. Dans une étude clinique que nous avons menée chez les patients opérés de résection pulmonaire, une altération précoce échocardiographique de la fonction cardiaque droite était retrouvée chez environ 50% des patients.

En 2016, un modèle animal de pneumonectomie droite chez le rat Sprague Dawley a été développé dans le laboratoire, dans le but de caractériser la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire développée dans ce contexte. Dans ce modèle expérimental, 4 semaines après la chirurgie, les rats ont développé une hypertension pulmonaire et un remodelage du coeur droit.

A notre connaissance, aucune étude n'a essayé de prévenir l'hypertension pulmonaire et le remodelage cardiaque droit après pneumonectomie. Les trois classes de traitements recommandées dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) idiopathique chez l'homme (inhibiteurs de la voie du NO, anti-endothéline1, analogue des prostacyclines) n'ont jamais été testés après pneumonectomie. Notre objectif principal dans cette étude est de tester ces traitements (inhibiteurs de la voie du NO, anti-endothéline1, analogue des prostacyclines, anti-PDGF) pour prévenir le développement de l'hypertension pulmonaire et de la dysfonction cardiaque droite, dans ce modèle expérimental de pneumonectomie droite chez le rat.

Les méthodes "*in vitro*" ne permettent pas à elles-seules de tester une nouvelle piste thérapeutique, d'où la nécessité d'utiliser un modèle animal.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de rats adultes Sprague-Dawley (nombre estimé : 180 animaux sur 5 ans). Les différents traitements seront testés après pneumonectomie droite (modèle du laboratoire), ou après injection de monocrotaline (modèle expérimental de référence d'hypertension pulmonaire sévère), et chez des rats "contrôles". Le critère de jugement principal pour l'efficacité est une diminution de la PAP systolique de 60 à 40 mmHg.

Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous réduirons le nombre d'animaux via une approche rationnelle et organisée sur le plan des protocoles (acquisition de données *in vivo* et *in vitro* menées en parallèle sur les mêmes animaux permettant d'apparier les mesures, de diminuer les groupes et d'optimiser les interprétations). Nous utiliserons de façon optimale les tissus des animaux sacrifiés. Nous réaliserons un maximum de mesures non invasives sur le même animal. Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites. Des traitements antalgiques sont prévus pour réduire la souffrance animale.

13094 Les mammifères sont soumis à des cycles d'alternance de trois états de vigilance : l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Le passage de l'un de ces états à un autre nécessite la mise en jeu de différents réseaux neuronaux, impliquant notamment le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO) de l'hypothalamus, une structure cérébrale, pour le déclenchement et le maintien du sommeil lent.

L'alternance entre l'éveil et le sommeil lent, la première phase du sommeil, est régulée par des interactions inhibitrices réciproques entre les neurones du VLPO et les structures responsables de l'éveil. L'activation des neurones du VLPO induisant le déclenchement et le maintien du sommeil lent fait intervenir deux processus : l'un homéostatique (accumulation de facteurs qui promeuvent le sommeil au cours de l'éveil) et l'autre circadien (régi par l'horloge interne).

Toutefois, bien que le sommeil soit un processus biologique universel et essentiel à la vie, les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu pendant le sommeil lent au sein du VLPO restent encore méconnus et représentent un défi majeur pour les neurosciences modernes. En effet, les troubles du sommeil touchent encore 30 % de la population française et favoriseraient l'apparition de nombreuses pathologies telles que l'hypertension artérielle, le diabète, la dépression ou encore les accidents vasculaires cérébraux. Ainsi, nous avons pour objectif d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le VLPO au cours du sommeil lent.

Ce projet de 4 ans se déroulera en plusieurs grandes étapes. Tout d'abord nous nous intéresserons aux rôles de facteurs trophiques dans la régulation des interactions neurogliales au sein du VLPO et donc dans la régulation du sommeil lent. Pour cela nous réaliserons des injections des vecteurs viraux et d'agents pharmacologiques permettant d'inactiver spécifiquement certaines voies de signalisation cellulaire dans le VLPO. Ainsi, grâce à des enregistrements polysomnographiques (Electroencéphalogramme, électromyogramme, électrocardiogramme), nous étudierons, *in vivo*, les effets sur la qualité et la quantité du sommeil lent des souris. Dans un second temps, nous étudierons *ex vivo* dans le VLPO de ces souris les variations morphologiques de la plasticité cellulaire des neurones et des astrocytes et les variations électrophysiologiques de ces neurones au cours du cycle veille-sommeil. Pour cela, les animaux précédemment utilisés pour les tests comportementaux seront euthanasiés dans l'objectif de prélever les cerveaux afin d'effectuer des analyses histologiques et électrophysiologiques.

La réalisation de ce projet nécessitera 604 animaux.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3R (remplacement, réduction, raffinement). Le nombre d'animaux utilisés est minimisé autant que possible et correspond au minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiques statistiquement significatifs. Il n'existe pas non plus d'autres modèles permettant de répondre à nos questions biologiques. En effet nous ne possédons pas les outils génétiques, physiologiques permettant cette étude sur un autre modèle. De plus, comme des études ont déjà été effectuées sur la souris, il est plus judicieux d'utiliser ce même modèle afin d'établir des comparaisons et de les compléter. Enfin, ce projet étudie une fonction biologique, en l'occurrence le sommeil, qui ne peut pas être étudiée *in vitro*.

Lors des procédures, nous utiliserons des anesthésiques et des analgésiques afin de réduire au maximum les techniques douloureuses. Chaque animal fera l'objet d'une surveillance accrue pendant la procédure, pendant les jours suivants et bien sûr pendant les expérimentations. Nos souris sont hébergées en groupe (6 animaux par cage au maximum et jamais d'animal isolé) en animalerie. Toutes les précautions sont assurées afin de respecter au mieux le bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement pour surveiller leur comportement. Tous les animaux seront suivis régulièrement pour leur alimentation, la présence de plaie ou si l'animal se gratte. Un suivi supplémentaire sera réalisé pour les animaux après chirurgie afin de vérifier en plus la cicatrisation de la plaie. Des antalgiques seront utilisés si des signes de douleur se manifestent. Tout indicateur de souffrance détecté conduira à l'arrêt de l'expérimentation.

A la fin des expérimentations *in vivo*, les cerveaux seront prélevés, après euthanasie, afin de mener des expériences histologiques, électrophysiologiques et, dans le cas d'implantation d'électrodes, de vérifier que les coordonnées d'implantation sont correctes. Enfin, un petit groupe d'animaux recevra une perfusion intracardiaque sous anesthésie générale afin de préparer les cerveaux à certaines expériences comme le FISH (Hybridation *in situ* en fluorescence, afin de marquer et localiser les ARNm) ou encore pour la transparasation de cerveau.

13095 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés (OMS, 2012) posant un problème majeur

tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable que de nouvelles stratégies thérapeutiques soit mises en place.

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

L'objectif de ce projet est de valider un modèle d'ischémie cérébrale qui mime au mieux la physiopathologie humaine en testant des molécules qui ont déjà été testées en clinique afin d'en comparer les effets. Pour répondre à notre problématique un modèle d'ischémie thromboembolique vigile récemment mis au point sera utilisé.

De ce fait, une première phase du projet portera sur la caractérisation de ce modèle par imagerie médicale (IRM, ultrason) associée à un suivi fonctionnel sur une durée de 7J. Dans une seconde phase, nous testerons l'efficacité de deux traitements : le Natalizumab et le NXY059, qui ont montré tous deux des bénéfices dans les modèles précliniques d'AVC, et qui ont récemment fait l'objet d'essais clinique. Un comparatif sera fait avec le traitement de référence des AVC, la fibrinolyse par le tPA.

D'après la littérature et une analyse de puissance statistique, le projet dans son ensemble nécessitera 555 souris Swiss mâles adultes de 8 à 10 semaines. L'espèce, le stade de développement et le genre ont été choisis en accord avec la littérature dans le domaine ainsi que la pertinence scientifique. Dans ce projet il n'est pas possible de remplacer le modèle animal pour étudier l'effet de l'anesthésie sur le développement des lésions cérébrales ainsi que la récupération fonctionnelle.

Cette étude prend en compte le bien-être des animaux et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R : La Réduction du nombre d'animaux utilisés est prévue par une limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, et par l'emploi d'une analyse de puissance statistique pour définir les groupes d'animaux, avant toute expérimentation. Dans ce projet il n'est pas possible de Remplacer le modèle animal, il s'agit d'étudier un nouveau modèle *vivo*, et de tester des molécules déjà validées *in vitro*. Les effets de l'anesthésie sur le développement des lésions cérébrales ainsi que la récupération fonctionnelle ne peuvent être investigués autrement que via un modèle *vivo*. Il est prévu d'étudier l'impact de l'anesthésie sur les vaisseaux sanguins cérébraux, le modèle murin est celui dont la caractérisation du système vasculaire est la plus détaillée. En amont de l'expérience, pour Raffiner l'expérimentation : le modèle animal utilisé a été choisi avec soin, les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement sont optimisées (cages standards aux normes européennes avec litière enrichie), le protocole est planifié pour éviter le stress, les animaux sont entraînés à coopérer pour les actes non invasifs et non douloureux. Nous avons établi des points limites (ou critère d'arrêt anticipé) de la procédure (3. 4. 13). Le raffinement concernant les méthodes et les procédures opératoires sera assuré par l'emploi de procédures non invasives (IRM, ultrasons...) dès que possible, par des soins adéquats avant, pendant et après l'opération, par l'utilisation d'anesthésie/analgésie (Anesthésie générale par inhalation d'isoflurane 5% dans un mélange de 70%/30% de N₂O/O₂, de la Buprénorphine pour assurer la couverture analgésique, vaporisation de Lidocaïne comme anesthésie locale). Le raffinement de l'étude sera également assuré par la réduction maximum de la durée de l'étude, par l'emploi de procédure d'euthanasie appropriée.

13096 La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer. Elle se manifeste principalement par des symptômes moteurs (le tremblement de repos, l'akinésie/bradykinésie et la rigidité) accompagnés fréquemment par de nombreux troubles

non-moteurs d'ordre cognitifs et émotionnels (anxiété et dépression). Elle est causée par la perte progressive des neurones dopaminergiques qui projettent vers le striatum, structure impliquée dans la réalisation des mouvements volontaires. L'étiologie de la MP est encore mal connue. Elle existe sous forme familiale liée à une hérédité génétique, mais les formes sporadiques sont de loin les plus courantes et seraient d'origines multifactoriels. Les études post-mortem ont révélé des dépôts de zinc dans les neurones dopaminergiques détruits chez les patients parkinsoniens et on pense que ces dépôts seraient en partie responsables de la mort cellulaire du fait que le zinc en excès devient cytotoxique. Ce projet de recherche vise à déterminer l'implication du zinc vésiculaire (ou synaptique), co-libéré dans le striatum avec le glutamate par les projections corticales, dans le développement de la MP. Il repose sur une approche multidisciplinaire chez la souris combinant des outils de la génétique, de la biologie cellulaire et de la pharmacologie comportementale. L'étude d'organismes modèles phylogénétiquement moins évolués, ou des outils moléculaires in-vitro ne peuvent répondre à cette recherche. L'approche génétique est la seule qui permet d'éliminer sélectivement le pool de zinc synaptique ou de bloquer spécifiquement son action au niveau des récepteurs glutamatergiques. L'approche pharmacologique permet de manipuler de manière aigüe la transmission synaptique et repose sur l'utilisation du zinc exogène et des chélateurs du zinc extracellulaire. Les effets des diverses manipulations génétiques et pharmacologiques seront analysés dans des tâches comportementales permettant de mettre en évidence chez le modèle murin les symptômes moteurs (akinésie, asymétrie posturale, déficits d'acquisition de tâches motrices) et non-moteurs (déficits cognitifs et émotionnels) de la MP. L'analyse comportementale est réalisée chez les animaux éveillés et de fait il est impératif qu'ils ne soient pas stressés pour ne pas compromettre leurs performances. Une procédure d'enrichissement du milieu est mise en place par l'ajout d'une litière foisonnante pour la nidification, des petits bâtonnets en bois à ronger et des tubes de cellulose permettant le jeu des animaux. Plusieurs dispositions sont mises en place pour la prise en charge de la contrainte que les animaux subissent suite à la procédure chirurgicale. Pour limiter la douleur, les animaux sont opérés sous anesthésie et traités au réveil par un antalgique opiacé puissant. Ils reçoivent ensuite une injection quotidienne d'un anti-inflammatoire pendant la période post-opératoire. Une grille de suivi post-opératoire du bien-être avec des points limites est mise en place pour détecter de manière précoce des signes physiques caractéristiques d'un mal être et dispenser le traitement adapté. Dans le cadre de ce projet, environ 1400 souris au maximum seront étudiées sur la période de 5 ans. Ce nombre sera aussi réduit en fonction des résultats les plus marquants obtenus dans les tests comportementaux. Ce projet de recherche devrait aboutir à une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la MP et pourrait ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques. Récemment, la chélation du Zn^{2+} a été proposée comme piste thérapeutique pour la prise en charge des maladies neurovégétatives comme la maladie d'Alzheimer. Notre étude permettra d'apporter des informations nouvelles concernant l'utilité de ces composés dans le contexte de la MP.

13097 L'hématopoïèse est un processus finement régulé qui aboutit à la production de toutes les cellules composant le sang. Chez l'adulte, ces cellules sont principalement produites dans la moelle osseuse (MO) à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et de progéniteurs hématopoïétiques. Le nombre et la qualité des CSH doivent être préservés afin d'une part de maintenir leur nombre et d'autre part, d'éviter leur transformation leucémique. Dans le laboratoire, nous nous intéressons au contrôle des propriétés « souches » des CSH, en particulier leur capacité à se régénérer de façon infinie. Ce processus est appelé l'auto-renouvellement. En absence de toute infection ou autres stress, les CSH sont dormantes, en revanche, elles s'activent et prolifèrent en réponse à un signal de stress type hémorragies, infections etc. Ce processus est appelé hématopoïèse de stress.

Il est important de comprendre comment se fait la régénération du système sanguin, en effet les CSH sont un outil de choix en médecine régénératrice en particulier pour les protocoles de thérapie cellulaire et génique en vue de transplantation. L'enjeu est de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de maintenir voire d'amplifier les CSH *in vitro* sans induire leur transformation leucémique ou leur différenciation en cellules plus matures.

L'expression de certaines protéines dont REDD1 sont induites en réponse à différents types de stress en particulier des stress génotoxiques (la chimiothérapie et les radiations ionisantes). Ces protéines ont pour fonction de protéger et de favoriser la régénération des CSH. Mais le rôle exact de REDD1 dans l'hématopoïèse n'est toujours pas connu. Ainsi, nous souhaitons déterminer les conséquences de la délétion de la protéine REDD1 dans les cellules hématopoïétiques. L'utilisation de modèles animaux est indispensable. Aucun système de culture cellulaire *in vitro* ne permet en effet de suivre les conséquences d'une telle délétion à l'échelle d'un organe et d'un organisme entier : le système hématopoïétique demande un environnement complexe pour être régulé correctement qui ne peut être récapitulé *in vitro*

Le modèle murin est un modèle éprouvé pour étudier les effets de l'absence d'un gène. De plus, c'est un modèle pré-clinique de choix pour mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et les tester. Notre choix se porte donc sur ce modèle.

Le rôle de REDD1 dans l'hématopoïèse en conditions physiologique sera effectué en comparant le nombre, la proportion et la qualité de toutes les cellules sanguines dans des souris normales et dans les souris déficientes pour le gène *redd1*. Pour étudier le rôle de REDD1 dans la reconstitution hématopoïétique sans ou après stress génotoxique, les cellules de MO de souris déficientes pour le gène *redd1* seront greffées en compétition avec des cellules de MO normale à des souris receveuses. La délétion du gène *redd1* n'est pas délétère pour les souris, elles sont viables, fertiles et en bonne santé générale.

Pour les transplantations de moelle osseuse, les souris receveuses sont préalablement irradiées puis greffées avec les cellules de MO normale et déficiente par voie intraveineuse. Le fait de recevoir de la MO normale garantit la survie des souris receveuses après irradiation. Les prélèvements sanguins sont effectués sous anesthésie générale. Une observation régulière et attentive des animaux est réalisée pendant toute la période des expériences. A la moindre manifestation de douleur ou de signes cliniques, l'équipe d'expérimentateurs intervient rapidement pour éviter toute souffrance par la mise en place de traitement analgésique. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et avec un environnement enrichi (des boules de coton et des tunnels de carton). Les animaux sont euthanasiés à la fin de l'expérience de manière à pouvoir prélever plusieurs organes hématopoïétiques (moelle osseuse, thymus). Plusieurs paramètres (par exemple le nombre et la fréquence de CSH et de cellules matures, leur capacité à proliférer) seront évalués dans ces organes. Ceci permet de limiter le nombre d'animaux à utiliser.

Le nombre d'animaux (3000 souris sur 5 ans) a été calculé en tenant compte des mises au point et des résultats des études précédentes et ajusté au minimum pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous utilisons des rongeurs, nés dans notre animalerie.

13098 L'objectif du projet est de comprendre sur des modèles expérimentaux chez le rongeur (souris) les propriétés des réseaux neuronaux qui sous-tendent l'encodage, le traitement et le stockage des informations ainsi que les déficits cognitifs associés aux principales pathologies cérébrales. Dans ce projet, nous allons utiliser des techniques de biologie moléculaire permettant de manipuler l'expression d'une protéine de la polarité planaire, *Vangl2*, qui non seulement participe au développement cortical (neurogénèse, guidage axonal, formation des synapses), mais est aussi fortement exprimée chez l'adulte dans la région hippocampique, dont elle semble moduler la fonction et l'implication dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Nous allons mener des investigations électrophysiologiques pour comprendre le rôle de *Vangl2* dans le fonctionnement du circuit de l'hippocampe.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies, ce qui représente un intérêt sociétal considérable.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif *in vitro* ou *in silico*. Nous avons opté pour l'utilisation de la souris car ces

rongeurs présentent le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les désagréments pour les animaux, liés aux conditions d'élevage ou d'expérimentation.

Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 240 souris, réparties sur une période de projet de 5 ans.

Les animaux utilisés sont des souris de lignées transgéniques qui expriment un marqueur moléculaire permettant de cibler spécifiquement les neurones, et de leur faire exprimer ou au contraire de réprimer l'expression de la protéine Vangl2. Il devient ainsi possible de tester des hypothèses quant au rôle de cette protéine dans le circuit de façon causale (que se passe-t-il quand on active ou quand on bloque expérimentalement l'expression de vangl2 dans telle ou telle population spécifique de neurones) et non plus seulement corrélative (quand cette protéine est elle exprimée). Les marqueurs moléculaires spécifiques des lignées utilisées ne sont pas associés à un phénotype dommageable, et sont donc sans conséquence sur leur bien-être. Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subies par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage enrichie avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. De plus concernant la procédure de chirurgie, une analgésie préalable, le mode d'anesthésie (gazeuse + locale) ainsi que le suivi-post opératoire permettent de réduire au minimum l'inconfort et la douleur de l'animal.

13099 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. Il est estimé de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucun ne permet à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparait primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées, tant que cela est possible, par des méthodes non invasives (échocardiographie) permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 490 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. A l'heure actuelle les mécanismes responsables du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire sont mal connus c'est pourquoi nous allons utiliser pour ce projet un modèle unique au monde de rat génétiquement modifié pour un gène retrouvé muté chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire afin d'étudier les mécanismes mis en jeu par ces mutations.

13100 La chlordécone est un insecticide qui a été utilisé dans les bananeraies des Antilles françaises, il est interdit depuis plus de 20 ans mais est encore présent dans les sols. Cette molécule est un polluant organique persistant qui peut être transféré dans la chaîne alimentaire. La question qui se

pose est celle du maintien de l'élevage dans les zones contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier des carcasses de ruminants dont les teneurs en polluants dépassaient les LMR les rendant impropres à la consommation.

La chlordécone est connue pour être métabolisée en chlordécol chez certaines espèces. Une étude récente (2018) a mis en évidence la présence de ce métabolite chez le porc. L'apparition de métabolites de la molécule mère et leur excrétion constituent des voies d'élimination de la chlordécone. Comprendre les mécanismes d'élimination du chlordécol permet de mieux comprendre le devenir de la chlordécone chez le porc et de compléter les données sériques et fécales de toxicocinétique de la chlordécone existantes chez le porc. 4 porcs mâles castrés en croissance seront utilisés pour l'étude envisagée. Ainsi, du chlordécol sera administré par voie intraveineuse via un cathéter jugulaire. Des prélèvements de sang et de fèces seront ensuite effectués dans les 3 jours suivant l'injection sur la seconde jugulaire cathétérisée. Une mise à mort réglementaire sera effectuée sur les 4 porcs à 72h afin de permettre des prélèvements de bile et de contenus digestifs.

Remplacement : pour obtenir ces informations, aucun remplacement n'est envisageable pour ce type d'étude. Les données collectées serviront à la construction d'un modèle compartimental de transfert de la chlordécone à l'échelle de l'animal et permettront de calculer finement les sorties de chlordécone de l'animal.

Réduction : Le nombre d'animaux sera limité au maximum pour des raisons d'éthique. Un nombre de répétitions de 4 apparaît cependant nécessaire et suffisant pour s'assurer de la puissance statistique nécessaire (sur la base de l'expérience antérieure de l'équipe de recherche en terme d'écart-type résiduels prévisibles pour les porcs et la sensibilité analytique du dosage de la chlordécone et de son métabolite).

Raffinement : Les animaux seront placés en logement collectif conformément à la réglementation, sauf à partir de la mise en place des cathéters jugulaires pour éviter les risques d'arrachement de cathéters soit sur une période de dix jours. Cependant afin d'assurer un maximum de bien-être aux animaux, les contacts visuel, auditif et olfactif seront préservés. Des éléments d'enrichissement du milieu seront ajoutés dans les boxes.

Points limites : Compte-tenu des interventions envisagées une surveillance régulière sera nécessaire. Lors de celles-ci, des comportements d'inconfort (prostration, refus de nourriture, vocalisation) seront relevés. Par ailleurs, une évaluation de la douleur sera réalisée quotidiennement sur le comportement de l'animal. On considèrera que toute chute de poids de plus de 10% entre deux pesées (une pesée ayant lieu une à deux fois par semaine) impliquera un protocole de soin ou une mise à mort en cas d'abatement profond.

13101 Le but de ce projet est de comprendre les processus neuronaux mis en jeu lors de la réinnervation d'un muscle par ses neurones de commande, suite à une lésion ou une amputation suivie de greffe. Plus précisément, deux questions fondamentales seront abordées : quels sont les mécanismes qui permettent aux cellules nerveuses motrices de cibler spécifiquement les muscles à réinnover dans le membre greffé ? Et quels sont les mécanismes neuronaux mis en jeu pour faire face, du point de vue de l'adaptation des comportements moteurs, à la perte puis la récupération d'un membre ? Afin de nous affranchir de tous les problèmes potentiellement liés aux greffes chez les Mammifères, nous avons choisi d'aborder cette thématique sur la salamandre (*Pleurodeles waltl*), un Amphibien particulièrement bien connu pour ses capacités naturelles de réparation tissulaire, notamment de repousse de membre et de récupération motrice après amputation. Par des approches combinées d'électrophysiologie et de neuroanatomie, nous analyserons, suite à l'amputation et au cours de la repousse de la patte, les adaptations survenant dans les cellules nerveuses de la moelle épinière qui commandent la contraction des muscles. En parallèle, nous suivrons le développement des

muscles dans la patte en cours de repousse, la mise en place des connexions neuromusculaires qui assureront la commande des mouvements du membre néoformé, ainsi que les adaptations sensori-motrices permettant à l'animal de préserver ses fonctions motrices lors des changements de son appareil biomécanique.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier dépendent des interactions entre divers éléments cellulaires et hormonaux qui ne peuvent se produire que dans un organisme complexe ; il ne nous est donc pas possible de remplacer l'animal dans ces recherches et la salamandre est un modèle de choix du fait de ses capacités naturelles extraordinaires à régénérer ses membres après blessure ou amputation, sans signe apparent de souffrance. Nous allons néanmoins mettre en place des procédures jusqu'ici très rarement usitées chez la salamandre d'analgésie, de désinfection et de suivi journalier, dans un souci d'améliorer le bien-être postopératoire des animaux amputés. L'étude complète nécessitera 280 animaux au total, répartis en 80 animaux témoins (la question posée étant entièrement originale, les données témoins sont absentes de la littérature scientifique) et 200 animaux amputés que nous étudierons à différents stades de la repousse du membre. Etant donné que ces travaux découlent principalement d'une étude que nous avons réalisée lors de la métamorphose chez une autre espèce d'amphibien (publication de haut rang en 2018), nous savons exactement quoi rechercher et comment le rechercher. Ceci nous a permis de calculer le nombre d'animaux nécessaires par groupe au plus bas pour donner des résultats statistiquement valides, en prenant en compte la variabilité classiquement observée en neuroanatomie d'une part et en électrophysiologie d'autre part. De même, les expériences ont été pensées de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, certaines expériences d'électrophysiologie de courte durée pouvant être réalisées sur des préparations *in vitro* qui, ensuite, seront fixées pour l'analyse neuroanatomique.

13102 Chez l'homme, lors d'une infection grave ou d'une chirurgie majeure, le système immunitaire va rapidement présenter des signes de dysfonctionnement. Cette altération du système de défense contre les infections est à l'origine du risque de développer des infections secondaires ou acquises à l'hôpital (infections nosocomiales). Il n'existe malheureusement pour le moment pas de traitement permettant une restauration des fonctions immunitaires lors d'un séjour en réanimation et les patients développent des infections nosocomiales, à l'origine d'une augmentation de la mortalité.

Afin d'étudier ces perturbations du système immunitaire, nous aimerions développer un modèle d'immunodépression acquise après infection abdominale chez des souris : une première infection abdominale chirurgicale agira comme le facteur déclenchant de l'immunodépression. Cette infection abdominale sera traitée par antibiotiques et n'entraînera pas la mort de l'animal mais sera à l'origine d'une immunodépression. Cette immunodépression sera caractérisée par l'étude du système immunitaire ainsi que par le développement d'une seconde infection, une semaine après la première, mimant ainsi la survenue d'une infection nosocomiale.

Ce projet permettra de maîtriser et caractériser un modèle d'immunodépression afin d'étudier des thérapeutiques immunomodulatrices, étape indispensable avant d'éventuelles études chez les patients.

Le respect de la règle des 3R dans ce projet se traduit par :

Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera de 680 souris.

1. Remplacement: le développement d'un modèle de dysfonctionnement du système immunitaire nécessite d'une part une infection ou une chirurgie comme facteur déclenchant et, d'autre part, l'accès aux organes d'intérêt pour évaluer les conséquences de cette immunodépression. Ceci n'est absolument pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour le développement de ce type de modèle.

2. Réduction: Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

3. Raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées: locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum, maximum 5 animaux/cage et aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage. L'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques permettra d'éviter toute

souffrance aux animaux. De plus, l'évaluation régulière du score de grimace des animaux et le suivi de leur poids et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé.

13103 Le cancer a longtemps été considéré comme une maladie incurable. Aujourd'hui, même si de nombreux patients parviennent à entrer en phase de rémission voire guérison, le cancer représente toujours une des causes majeures de mortalité en France. La principale raison à cela est la résistance des cellules tumorales face aux traitements, voire leur transformation en métastases (i. e. dissémination dans l'organisme pour affecter d'autres organes), ce qui rend les espoirs de guérison des patients bien plus minces. Grâce aux avancées scientifiques, nous savons aujourd'hui que le cancer regroupe des pathologies très différentes les unes des autres puisque chaque cancer implique des dysfonctionnements cellulaires très spécifiques. De ce fait, le développement de nouvelles thérapies nécessite une meilleure compréhension de tous ces mécanismes. L'étude d'efficacité d'antitumoraux est faite dans un premier temps par tests *in vitro*. Cependant, le développement de tumeurs et leur transformation en métastases sont des processus intrinsèquement liés aux microenvironnements dans lesquels elles se trouvent. Des modèles d'étude plus complexes sont donc nécessaires. De plus la dissémination des métastases est un phénomène physiologique utilisant l'organisme en entier, notamment par leur passage dans le système lymphatique et/ou sanguin.

Le modèle animal étant le seul à réunir tous ces paramètres physiologiques, son utilisation est donc une étape primordiale de la mise au point de thérapie anticancéreuse.

L'objectif de ce projet est de greffer des tumeurs chez la souris pour tester les propriétés antitumorale et anti métastatique de principes actifs. Les produits qui seront détectés comme « candidat-médicaments » pourront alors être promus pour le montage de dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et donc la réalisation d'études précliniques réglementaires.

Pour raffiner le bien-être des animaux, une période d'acclimatation (>48h) sera réalisée à leur arrivée dans l'animalerie. Leur environnement sera adapté à leurs conditions de bien-être (température / lumière / hygrométrie / hébergement en groupe avec enrichissement) excepté si les objectifs de l'étude s'y opposent. Si les animaux n'ont pas été identifiés préalablement, ils le seront à leur arrivée en zone d'étude, selon les procédures en vigueur des lieux d'expérimentation (tatouage aux phalanges, poinçons et/ou encoches à l'oreille, marqueur sur la queue/le pelage, puces).

Les techniques expérimentales pouvant engendrer du stress seront le plus possible limitées et feront l'objet d'une anesthésie si cela est nécessaire, en accord avec les recommandations éthiques internationales. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés tout au long des procédures pour anticiper toute dégradation de leur bien-être. Des mesures spécifiques seront prises le cas échéant, sur avis du vétérinaire référent si besoin (traitement/soins, enrichissement spécifique, etc.).

Pour éviter toute douleur et/ou souffrance inutile des animaux, des points limites généraux ont été définis et certains points limites spécifiques pourront être fixés au cas par cas en fonction des études et des modèles animaux.

En s'appuyant sur nos prévisions d'études, nous estimons utiliser 2880 souris par an (soit 14 400 pour les 5 ans du projet), ce qui représente l'évaluation d'environ 20 composés. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude sera réduit au maximum, en se basant sur les résultats obtenus lors d'études préliminaires, tout en garantissant l'exploitabilité des résultats expérimentaux.

13104 Contexte scientifique : Les muscles squelettiques ont pour fonction de générer force et mouvement afin d'assurer la motricité du corps dans son environnement. Cette production de force est assurée par des moteurs moléculaires nécessitant de l'énergie chimique présente dans la cellule sous forme d'ATP. L'ATP est essentiellement produite par les mitochondries, des organites présents en grande quantité dans les cellules musculaires. Au cours de la vie, les mitochondries musculaires subissent des modifications importantes au niveau de leur morphologie et de leur quantité. En particulier, on observe une réduction de leur volume et de leur densité lors de la perte musculaire induite par le

vieillesse (sarcopénie) et par la maladie. Une fonte musculaire (cachexie) est en effet fréquemment observée dans de nombreuses pathologies dont le cancer du pancréas. Ce type de cancer entraîne une diminution de la masse musculaire pouvant atteindre 20 à 30% ce qui, en plus de réduire l'efficacité des traitements, provoque un affaiblissement généralisé qui augmente la mortalité. Il est à présent clairement établi que les développements de la sarcopénie et de la cachexie s'accompagnent de l'apparition de dysfonctionnements mitochondriaux qui se traduisent non seulement par une diminution de la capacité à produire l'ATP mais également par une surproduction d'espèces chimiques oxygénées (radicaux libres) favorisant la mort cellulaire. De manière intéressante, des études ont associé ces dysfonctionnements mitochondriaux avec une dégradation de la fonction musculaire (fatigabilité accrue, diminution de la capacité à produire la force). Cependant, les relations de cause à effet entre perte de masse musculaire, dysfonctionnement mitochondrial et altération de la fonction musculaire demeurent sujet à controverse en partie à cause des différentes mesures utilisées pour évaluer la fonction mitochondriale. Par ailleurs, il est important de souligner que bien que le développement de la sarcopénie soit moindre chez les femmes (comparé aux hommes), l'atteinte mitochondriale de leur muscle est plus importante, ce qui démontre un effet du sexe. De plus, nous en savons très peu sur les modifications moléculaires au sein de la mitochondrie au cours du développement de la sarcopénie et de la cachexie. Etant donné le vieillissement des populations et, en retour, l'augmentation des cas de cancer, il est donc urgent de mieux comprendre les bases fondamentales de l'implication de la mitochondrie dans le développement de la sarcopénie et de la cachexie cancéreuse, ceci notamment pour la mise au point de stratégies thérapeutiques permettant de lutter contre ces différents types d'amyotrophie.

> Objectif du projet : L'objectif de ce projet est d'analyser au cours du développement de la sarcopénie et de la cachexie cancéreuse les modifications morphologiques et métaboliques de la mitochondrie en relation avec la fonction musculaire (fatigabilité, capacité à produire la force). Les données obtenues seront précieuses pour toute la communauté scientifique car elles permettront de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans ces modifications morphologiques et métaboliques, et ainsi identifier des cibles potentielles susceptibles de prévenir ou de retarder la perte musculaire induite par le cancer et le vieillissement. Par conséquent, nos résultats sont susceptibles d'avoir des impacts économique et sociaux-culturels majeurs sur notre population qui aspire à vieillir en bonne santé.

Le projet sera réalisé chez des souris mâles et femelles de deux types : des souris saines de type C57BL/6 qui seront étudiées à différents âges (caractérisation du développement de la sarcopénie) et des souris de type KPC qui présentent une prédisposition pour développer un cancer du pancréas (caractérisation du développement de la cachexie). Nous allons utiliser une approche pluridisciplinaire combinant (i) des explorations non invasives du métabolisme énergétique et de la fonction musculaire (par RMN *in vivo* sur animaux anesthésiés), et (ii) des mesures *ex-vivo* sur échantillons musculaires (obtenus *post-mortem*) permettant de déterminer l'expression des gènes mitochondriaux (par biologie moléculaire), et la morphologie et la densité des mitochondries (par microscopie électronique).

> Conformité de la règle des 3R. Le recours aux animaux est indispensable pour ce projet. En effet, les données expérimentales devront être en grande partie obtenues sur des échantillons musculaires provenant d'organismes âgés et/ou cachexiques, et cette démarche ne peut pas être réalisée chez l'homme. Par ailleurs, les critères métaboliques et fonctionnels que nous allons étudier sont de types physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer l'étude chez l'animal vivant. Toutefois, nous n'utiliserons que le nombre de souris nécessaires pour l'exploitation statistiques des données, à savoir 210 individus (14 groupes de 15 souris).

Concernant le raffinement, les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation (coton), d'abris en plastique permettant aux animaux de se cacher, et de bûchettes de bois destinées à être rongées. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies *ad libitum*. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine. Par ailleurs, l'utilisation de la RMN sur animaux anesthésiés par inhalation

gazeuse permettra de par son caractère non invasif et totalement indolore de réduire le stress des animaux. La RMN réduira également le nombre d'animaux utilisés car elle permettra d'obtenir pour chaque animal des mesures du métabolisme énergétique dans différentes conditions (repos, activité musculaire, récupération post-activité) au cours d'un seul examen, contrairement aux techniques classiques de biochimie qui auraient nécessité de sacrifier des cohortes d'animaux pour chacune de ces conditions afin de réaliser des dosages métaboliques sur biopsies musculaires. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation de la douleur par score avec indices de 0 (normal) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux, et des actions seront à mener en fonction des scores obtenus (état normal pour des scores de 0 à 3 ; surveillance rapprochée obligatoire pour des scores de 4 à 8 ; souffrance sévère avérée impliquant l'arrêt immédiat du protocole et l'euthanasie de l'animal pour des scores supérieurs à 8). A la fin de l'étude, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale induite par inhalation d'isoflurane afin de réduire au maximum leur douleur et leur détresse.

> Conclusion. Cette étude permettra de mieux comprendre les bases fondamentales de l'implication de la mitochondrie dans le développement de la sarcopénie et de la cachexie cancéreuse, et devrait permettre à terme la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques pour une meilleure prise en charge des personnes âgées et/ou atteintes de cancer.

13105 Notre équipe cherche à élucider les mécanismes neurobiologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire impliqués dans la formation et la stabilisation des souvenirs chez le rongeur. Nous nous intéressons à l'interface entre l'hippocampe et le cortex, structures clés dans ces processus. Notre projet vise à révéler la plasticité vasculaire cérébrale par angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) qui soutient l'activité neuronale lors des processus de mémorisation. Nous espérons ainsi révéler de nouveaux mécanismes favorisant ces processus, sur lesquels il sera possible d'agir pour ralentir les déficits observés dans des pathologies neurodégénératives (Alzheimer, démences vasculaires, ...).

Des rats sont soumis au test de transmission sociale de préférence alimentaire pour appréhender les différents processus de la mémorisation (encodage, consolidation et rappel des souvenirs). Basé sur un comportement social éthologique, il est non-aversif et peu source de stress. Les rats sont hébergés en cage individuelle pour pouvoir contrôler la quantité de nourriture consommée. Ils disposent d'un enrichissement, et sont habitués aux expérimentateurs et aux conditions du test pour limiter le stress. Nous utilisons une approche invasive qui consiste à augmenter ou diminuer la densité des réseaux vasculaires ou l'activité neuronale. Pour ce faire, nous injectons des agents pharmacologiques dans la structure cérébrale d'intérêt par un système installé à demeure sous anesthésie. Nous chercherons ainsi à définir les liens entre l'efficacité des réseaux vasculaires et l'activité neuronale, support biologique de la mémoire. Les rats sont testés pour leur mémoire récente (1 jour) ou ancienne (30 jours), puis leurs cerveaux sont collectés pour analyser les modifications de différents marqueurs neurobiologiques et vasculaires induites par les activités de mémorisation.

Dans les études sur la mémoire, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par des méthodes de substitution. Le raffinement des protocoles, qui consiste à agir sur la cible choisie par injection, permettra de réduire le nombre d'animaux et les effets secondaires potentiels des agents pharmacologiques. Par ailleurs, le bien-être des animaux, engagés dans un test comportemental, est crucial pour assurer de bonnes performances ; leur suivi est quotidien, et nous veillons à leur éviter tout inconfort. Des points limites ont été définis pour juger du degré de douleur, de détresse ou de stress au-delà duquel nous considérerons que la souffrance justifie l'euthanasie.

Le projet proposé nécessitera un total de 900 rats sur 3 ans, soit 300 animaux par an.

13106 Comment nous repérons-nous dans l'espace, comment savoir où nous sommes, et comment nous déplacer de manière optimale vers un objectif ? A la fin des années 1940, le psychologue Américain Edward Tolman proposa que pour se repérer et naviguer dans notre environnement, nous devons

au préalable en créer une représentation mentale flexible ou « carte cognitive ». Ce ne fut que 25 ans plus tard que fut caractérisé dans une région cérébrale particulière (l'hippocampe) un groupe de cellules dont l'activité code la localisation de l'animal dans son environnement (les cellules de lieu). Plus récemment, la présence de cellules permettant un codage de la totalité de l'environnement accessible à l'animal a été rapportée dans le cortex cérébral. Ce réseau neuronal constituerait ainsi la base d'un système de positionnement cérébral nous permettant de savoir où nous sommes. De manière intéressante, il apparaît que ce réseau coderait également la position de l'objectif à atteindre (savoir où aller). Ainsi, grâce à ce « GPS cérébral », nous saurions où nous sommes et où nous devons aller. Comment pouvons-nous alors naviguer efficacement entre ces deux points ? Les théories actuelles indiquent qu'une navigation réussie nécessiterait une planification préalable du trajet. Celle-ci pourrait s'apparenter à un 'voyage mental' entre les points de départ et d'arrivée. Cependant, la quasi-totalité des études sur la navigation spatiale utilise des animaux extrêmement bien habitués à leur environnement et des tâches dites de « mémoire de travail » spatiale, c'est-à-dire comportant peu de possibilités de trajets (le plus souvent seulement 2 : tourner à droite ou à gauche) et plusieurs centaines d'essais par session. Ces approches expérimentales semblent bien éloignées des conditions présentes en milieu naturel, que ce soit chez l'Homme ou chez le rongeur. En effet, nous naviguons souvent dans des environnements peu familiers. Ainsi, nous ne savons toujours pas comment cette planification se met en place au cours d'un apprentissage plus proche des conditions de navigation en milieu naturel. Afin de caractériser le réseau neuronal sous-tendant ce processus indispensable à une navigation réussie, nous combinerons des approches optogénétiques, électrophysiologiques et comportementales ainsi que des approches d'imagerie calcique chez des souris mâles CD1. La mémoire spatiale étant précocement altérée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, incluant la maladie d'Alzheimer, comprendre comment les réseaux neuronaux sous-tendent ces processus chez l'animal sains est un prérequis afin de pouvoir identifier, sur le plus long terme, de nouvelles approches thérapeutiques (comme la stimulation profonde de régions cérébrales spécifiques...). Un effort tout particulier est fait pour suivre la règle des 3R. Remplacement: Dans la mesure où nos travaux portent sur l'étude des fonctions mnésiques couplées à des enregistrements intracérébraux, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier éveillé, soumis à des tests comportementaux. Réduction: le nombre d'animaux nécessaire a été diminué le plus possible (ce projet prévu sur 5 ans utilisera 125 souris mâles) en tenant compte du nombre minimal d'animaux nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Raffinement: Le choix des approches a été guidé pour ses pertinences par rapport à l'hypothèse à tester et le choix de l'espèce par son adaptation naturelle à réaliser le test avec un minimum de stress ainsi que sa pertinence par rapport à la question posée. L'état de santé des animaux sera monitoré tout au long des expériences et des points d'arrêts anticipés (points limites) seront définis (grille de notation).

13107 Le vitiligo est une pathologie de la peau caractérisée par l'apparition de taches blanches au niveau du corps. Elle touche 1% de la population, elle est très stigmatisante et entraîne des problèmes sociaux et psychologiques majeurs chez les patients atteints. Cette maladie dermatologique est associée à une perte de mélanocytes (cellules à l'origine de la pigmentation de la peau) au niveau de l'épiderme. Cette maladie ne dispose pas à ce jour de traitement efficace et il paraît important de tester de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce modèle d'étude, nous souhaitons tester les effets de nouveaux traitements déjà identifiés au laboratoire (à des doses non nocives) chez la souris développant spontanément un vitiligo afin de se placer dans un contexte ressemblant à la pathologie chez l'homme.

Ce modèle souris a été préalablement validé et publié par des chercheurs dans la littérature. Il est basé sur l'intérêt de stimuler le système immunitaire (système des défenses de l'organisme) contre des éléments du mélanocyte par différentes étapes : 1/ injection sous cutanée de cellules de mélanome (tumeur issue des mélanocytes) afin de sensibiliser le système immunitaire contre les mélanocytes, puis 2/ d'éliminer les cellules de mélanomes (afin que les souris ne développent pas de cancer). Ces étapes permettent ainsi d'activer une réponse inflammatoire contre les mélanocytes de façon importante et d'induire une dépigmentation des souris. Les souris ainsi développent une

dépigmentation et peuvent être utilisées comme modèle murin de vitiligo. Une fois que nous aurons mis en place ce modèle, nous pourrions tester différentes thérapies afin d'évaluer si celles-ci permettent de bloquer la dépigmentation et/ou permettent la repigmentation des souris. Au cours de ce modèle nous utiliserons une lignée de souris transgénique de couleur noire, caractérisée par la présence sur toute la peau de mélanocytes localisés au niveau de la base de l'épiderme (alors que chez la souris sauvage, les mélanocytes sont localisés principalement au niveau du pelage ce qui est différent de l'homme).

Nous utiliserons le minimum d'animaux nécessaire pour réaliser notre projet. Toutes les démonstrations ne nécessitant pas impérativement une expérimentation animale seront réalisées *in vitro*. Nous aurons besoin de 660 souris pour que les données soient statistiquement analysables. Dans le respect de la règle des 3R, comme il n'existe pas de possibilités de Remplacement, nous procédons par étape dans la mise en place de notre modèle de souris vitiligo pour Réduire au mieux le nombre minimal d'animaux afin d'obtenir des analyses comparatives et statistiques suffisantes à la démonstration de l'effet des traitements inhibiteurs utilisés. Afin de respecter la notion de Raffinement, des mesures de surveillance seront réalisées par les intervenants et le personnel de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet que les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ni signe de souffrance. Les animaux seront évalués quotidiennement par le personnel qualifié et compétent qui sera en charge de leur soin et leur hébergement. Tout problème concernant l'état de santé des animaux sera communiqué à l'expérimentateur qui prendra la décision de mettre à mort sur des critères objectifs en cas de souffrance. Les souris seront hébergées à raison de 5 souris / cage dans un environnement propice à leur bien-être (litière en copeaux de peuplier, tunnels en polycarbonate).

13108 La protéine SOCS-2 (Suppressor of Cytokine Signaling 2) régule la signalisation depuis plusieurs récepteurs de cytokines et de ligands microbiens. Son rôle dans la croissance a été bien étudié mais son rôle dans l'immunité est beaucoup moins bien connu. Au cours d'une analyse génétique d'association (GWAS) sur la prédisposition aux infections mammaires chez le mouton, nous avons identifié une mutation ponctuelle (p. R96C SOCS2) qui corrèle avec la prédisposition à ces infections. Par ailleurs, les ovins porteurs de la mutation à l'état homozygote ont un poids et une taille environ 15 à 20% plus grands que ceux des congénères homozygotes non mutés. Nous avons montré que la mutation ponctuelle abolissait la liaison de SOCS-2 à ses ligands, avec comme conséquence une inactivation fonctionnelle de la protéine.

Les régions fonctionnelles de la protéine SOCS2 étant identiques entre tous les mammifères, nous avons développé un modèle d'introgession de la mutation chez la souris par recombinaison homologue pour l'étude des conséquences biologiques de la mutation ponctuelle.

Afin de caractériser finement la taille des souris dans les lignées obtenues, nous souhaitons utiliser la technique de tomographie à densité (CT) afin de mesurer la longueur des os longs (humérus, radius, fémur, cubitus) et de la colonne vertébrale, et déterminer ainsi les effets de la mutation sur la croissance des souris.

Le recours à cette technique d'imagerie non invasive rentre dans la démarche d'application de la règle des 3R. En effet, cette méthode permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car l'analyse s'effectue sur animaux vivants. Ces mêmes animaux peuvent donc être réutilisés pour l'étude de leur profil immunitaire. De plus, la précision et la sensibilité des mesures permet également de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour mettre en évidence des différences significatives entre les génotypes. D'autre part, cette technique permet de raffiner la procédure puisqu'elle n'implique aucune douleur pour l'animal et les différentes étapes du protocole ont été optimisées pour veiller au respect du bien-être de l'animal. Après induction de l'anesthésie à l'isoflurane, le débit est maintenu au taux le plus bas possible (0,5 à 2%) et l'anesthésie durera 15 minutes environ. La température corporelle ainsi que le rythme respiratoire seront suivis pendant toute la durée de l'analyse qui sera de 10 minutes maximum. La souris sera ensuite replacée dans sa cage sur une couverture chauffante et surveillée jusqu'à son réveil. Les cages bénéficieront d'un enrichissement adapté (igloo, tunnel et/ou coton). Tout animal présentant des signes de souffrance ou de léthargie

sera exclu de l'étude puis euthanasié par dislocation cervicale. En effet, des points limites ont été établis dans ce but, selon les critères suivants :

- Signes cliniques (niveau d'activité, agressivité, posture, réaction à la manipulation, toilettage, vocalisation)
- Signes physio-pathologiques (rythme respiratoire, température, perte de poids, déshydratation).

La taille des os sera déterminée chez 10 souris mâles au maximum de chacun des deux génotypes (homozygote sauvage ou muté) à l'âge de 10 semaines. La taille est peu variable au sein d'un groupe de souris d'une même lignée et au même âge. La différence attendue est du même ordre que celle observée chez le mouton et cet effectif sera suffisant pour démontrer la différence en relation avec le génotype *Socs2* de façon certaine.

13109 Chez un individu sain, le contrôle de la glycémie se fait par l'insuline, une hormone sécrétée par le pancréas. L'insuline permet l'entrée du sucre dans les cellules pour qu'il soit utilisé comme carburant, particulièrement dans les muscles et le foie. Chez une personne atteinte de diabète de type 2, l'organisme devient incapable de réguler la glycémie, c'est-à-dire le taux de glucose dans le sang. La glycémie s'élève (on parle d'hyperglycémie), et avec le temps, une insulino-résistance s'installe. Certains lipides complexes, favorisent la résistance à l'insuline, et contribuent à l'installation du diabète. Les inhibiteurs de la synthèse de ces lipides complexes pourraient réverser l'insulino-résistance. Les objectifs de notre projet sont de i) caractériser le mécanisme d'action des inhibiteurs de synthèse de ces lipides complexes et ii) identifier de nouveaux marqueurs associés au développement de cette pathologie. Pour ce projet, en accord avec la littérature nous utiliserons des modèles murins appropriés et la voie d'administration des inhibiteurs pharmacologiques la moins contraignante pour l'animal. Les avantages de ces animaux sont de pouvoir tester facilement (dans la durée et avec des doses limitées d'agent) un grand nombre d'hypothèses. Les dommages relevant de cette pratique pourraient résider dans l'abus de l'utilisation de ces animaux, nous sommes donc particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R et selon la directive européenne 2010/63/UE:

Remplacement : Les animaux sont utilisés après des analyses réalisées *in vitro* afin de confirmer des résultats démontrés et des hypothèses formulées à partir des travaux réalisés sur cellules. A ce stade de l'expérimentation, l'utilisation de l'animal est inévitable. Actuellement aucun modèle *in vitro* ne permet de mimer le phénomène étudié dans son ensemble et dans sa complexité. Les études sont systématiquement optimisées (doses inhibiteurs, durée du régime) d'après la littérature ou les observations réalisées au laboratoire. De plus les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (par priorité : alimentation ou boisson/injection IP/ injection IV).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, les expériences sont planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter de programmer des séries inutiles. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (volume à injecter, durée du traitement...). Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons autorisés réglementairement sont extraits de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de tissus. Pour la réalisation de ce protocole, nous aurons besoin de 180 souris.

Raffinement : L'application de la politique de réduction mise en place permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animaux un maximum d'informations. De plus la formation des personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir dans des conditions appropriées permet de réaliser nos expérimentations dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Les animaux sont hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et auront à disposition des igloos et des bâtons à ronger.

Les résultats devraient permettre de comprendre comment certains lipides complexes contribuent à l'insulino-résistance, et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques contre le développement du diabète.

13110 L'angiogenèse est un processus permettant la formation de nouveau vaisseaux à partir des vaisseaux pré-existants. En physiologie, l'angiogenèse est très importante lors du développement embryonnaire ou lors de processus de cicatrisation. Des altérations du processus angiogénique jouent également un rôle dans certaines pathologies. Ainsi, un excès d'angiogenèse joue un rôle primordial dans la croissance tumorale, ainsi que dans la dissémination des cellules cancéreuses permettant la formation de métastases. Inhiber l'angiogenèse apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le cancer.

L'objectif de ce projet est de caractériser le potentiel anti-angiogénique des polyphénols et des microvecteurs (MV), petites vésicules synthétiques (sMV) ou naturels (nMV) chargés en polyphénols. Les polyphénols et les MV présentent une activité anti-angiogénique et anti-cancéreuse *in vitro*. Afin de caractériser l'effet de polyphénols et des MVs chargés en polyphénols sur l'angiogenèse *in vivo*, nous utiliserons un système de greffe (en sous-cutané) d'une matrice extracellulaire qui permet de créer un environnement favorable à la formation de vaisseaux sanguins. Cette matrice sera injectée en présence de cellules endothéliales préalablement stimulées *in vitro* avec les MVs ou les polyphenols.

En parallèle, un second modèle sera testé ; des cellules tumorales humaines seront injectées chez la souris en sous-cutané, puis les animaux seront gavés avec les MVs ou les polyphenols afin d'étudier leur effet anti-cancéreux.

Les cellules endothéliales et tumorales utilisées étant d'origine humaine, des souris de type Nude seront utilisées afin d'éviter toute réaction immunitaire.

Ces deux modèles ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum (260 souris) sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. De plus, pendant les différentes procédures expérimentales, le recours aux anesthésiants, analgésique, anti-inflammatoire, ainsi que l'utilisation de tapis et lampe chauffants sera primordiale pour soulager l'inconfort, la douleur et la détresse des animaux. Une grille présentant les points limites sera utilisée pour déterminer la conduite à tenir.

Une telle étude nous permettra de caractériser l'effet anti-cancéreux et plus particulièrement l'effet anti-angiogénique des polyphénols et des MVs *in-vivo*, d'établir les produits plus efficaces en les comparant et développer le potentiel thérapeutique anti-cancéreuses des MVs.

13111 La réponse du système immunitaire est contrôlée par les cellules de type macrophage. Une meilleure compréhension des facteurs qui régulent leur activité va permettre de générer des vaccins plus efficaces et éventuellement des nouvelles thérapies contre des maladies comme le cancer. Nous avons découvert chez la souris que l'absence de molécules nommées RANK et RANKL provoque la perte d'un certain type de macrophage. Afin d'étudier comment son absence affecte l'activité du système immunitaire nous allons immuniser des souris avec des virus. Ces virus sont peu offensifs mais sont très immunogènes. Nous allons ensuite étudier la réponse anti virale. Le nombre total des souris est de 400 animaux. Les prélèvements et les immunisations seront effectués sur les souris sous anesthésie générale et par un personnel compétent. Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences de culture cellulaire *in vitro* car actuellement il n'existe pas de méthodologie qui reproduit la complexité cellulaire nécessaire afin d'induire et d'étudier la réponse immunitaire. Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement, et nous efforçons de réduire au mieux une éventuelle souffrance des animaux.

13112 Les affections ostéoarticulaires chroniques sont la première cause de morbidité au monde en touchant environ 20% de la population et tout particulièrement les adultes de plus de 50 ans. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité. L'arthrose est causée par la dégénération des articulations due à une usure progressive du cartilage. En plus de cette usure, l'arthrose est associée à un remodelage des os sous cartilagineux, la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes), un affaiblissement des ligaments et des muscles et dans les cas les plus sévères, une inflammation articulaire.

Les traitements des affections ostéoarticulaires sont basés principalement sur le soulagement de la douleur intense et de l'inflammation : traitements antalgiques et analgésiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens ou anti-inflammatoire de type corticoïdes. Si l'inflammation peut être contrôlée chez certains patients, il n'existe malheureusement à ce jour, aucun traitement permettant de guérir la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. Cela s'explique par une variabilité des manifestations cliniques entre chaque patient. La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre les rhumatismes chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale. Les modèles d'arthroses sont exclusivement réalisés chez le rongeur (rats et souris), offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Le but de cette saisine est donc, dans un premier temps, de mettre au point un modèle d'arthrose induite par chirurgie chez le rat, selon les modèles largement décrits dans la littérature (procédure n°1). Notre société étant une CRO qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique, le deuxième objectif de la présente saisine est d'évaluer de nouveaux composés créés et développés par nos clients pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse mais aussi la douleur (procédure n°2). Cette deuxième procédure est une procédure générique (vu avec les autorités compétentes) étant donné que nous ne connaissons pas à l'avance les différents composés qui seront à tester.

La saisine est donc divisée en 2 procédures :

La procédure expérimentale n°1 : Optimisation du modèle d'arthrose chez le rat basé sur ce qui est décrit dans la littérature. Le but étant de valider le modèle le plus proche de la pathologie humaine et de définir des composés de références appliqués en clinique. Nous évaluerons l'efficacité des différentes molécules de référence (anti-inflammatoire, visco-supplément, ...). La procédure 1 comptera 120 rats.

Procédure expérimentale n°2 : Une fois, le modèle validé, différents candidats médicaments en comparaison à un produit de référence adapté seront étudiés et appliqués selon les schémas thérapeutiques inhérents aux candidats médicaments, dans le cadre d'études menées au sein de la société. Un maximum de 100 animaux par étude sera considéré en prenant en compte la capacité d'hébergement et de gestion des animaux par notre équipe. Nous estimons réaliser 3 études par an, sur 5 ans. Ainsi, la procédure n°2 comptera 1500 animaux.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour :

Remplacer : la pathologie arthrosique étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Toutefois, les principes actifs seront préalablement testés *in vitro* afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs.

Réduire : pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes.

Raffiner : les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Pour cela, la réalisation des chirurgies dans les conditions d'asepsie d'un bloc opératoire et

par des chirurgiens formés permet de réduire le traumatisme chirurgical et les complications septiques. Outre la gestion de l'analgésie et de la procédure anti-inflammatoire pré et postopératoire, l'état général et clinique des animaux est surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un porteur du projet pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière sera plus spécifiquement axée sur les douleurs généralement occasionnées par les rhumatismes et permet la mise en place, si nécessaire, d'un traitement le plus précocement possible. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

13113 Le virus Machupo (MACV) est l'agent étiologique de la fièvre hémorragique bolivienne. Identifié en 1959, il a été à l'origine de plusieurs épidémies dans les années 70, causant 25 à 35% de mortalité. Après une trentaine d'années sans émergence signalée, MACV a causé depuis 2005 des épidémies récurrentes en Bolivie. Bien qu'étant un problème de santé publique majeur en Amérique du Sud, il n'existe à ce jour aucun vaccin pour prévenir les infections à MACV et aucun traitement complètement efficace. Le développement de vaccin a notamment été ralenti par le manque de connaissances sur ce pathogène de classe 4. Le projet de recherche proposé ici se concentre sur une meilleure compréhension des infections à arénavirus et sur le développement de contre-mesures. En ce sens, un vecteur Mopeia (MOPV) recombinant super-atténué exprimant des antigènes d'autres arénavirus a été développé. L'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité de ce vaccin contre le virus de Lassa a déjà été démontrée chez le singe cynomolgus. Des candidats vaccins exprimant des antigènes d'arénavirus pathogènes pour l'Homme, dont un vaccin pour la fièvre hémorragique bolivienne.

Le but de ce projet est de démontrer l'innocuité de ce candidat vaccin ainsi que son immunogénicité. Son efficacité contre le virus Machupo sera évalué sur les mêmes animaux dans un autre établissement.

Le recours à l'animal et notamment aux primates non-humains ne peut être substitué car il n'existe pas de modèles *in vitro* ou rongeurs capables de reproduire la physiopathogénèse et les réponses immunitaires retrouvées chez l'Homme au cours de la fièvre hémorragique Bolivienne. Dans ce projet, 12 macaques Cynomolgus seront utilisés et répartis en 3 groupes pour tester le candidat vaccin en dose unique ou répétée. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, 4 animaux/groupe est un nombre satisfaisant pour être représentatif statistiquement (Logrank test).

Un effectif de trois animaux est indispensable pour les contrôles positifs afin d'attester l'apparition de symptômes marqués chez ces animaux et très probablement de l'issue fatale de la maladie (après challenge infectieux). Pour les animaux vaccinés, 4 animaux par groupe représentent le minimum permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs par comparaisons des groupes deux à deux et pour attester de l'efficacité du vaccin sur l'ensemble des animaux. Après le challenge infectieux, l'apparition de symptômes et les constantes biologiques seront des critères suivis et exploités dans l'analyse statistique des résultats en plus du taux de survie entre les différents groupes.

Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale (+antalgique si nécessaire) pour éviter toute souffrance ou stress. De plus, des sondes de température implantables (télémétrie) seront mises en place afin de pouvoir monitorer les animaux en temps réel et donc raffiner la surveillance des animaux (pas de contention nécessaire). Les animaux seront hébergés en groupe social et bénéficient d'un programme d'enrichissement adapté. 2 précédentes études avec un protocole similaire ont déjà été réalisées, et n'ont pas mis en évidence de dommages aux animaux.

13114 Les accidents vasculaires cérébraux ischémiques (AVCi) sont la première cause de handicap acquis et la 2e cause de troubles cognitifs en France. Les infections bactériennes sont fréquentes dans les jours suivants un AVCi et entraînent une augmentation de la mortalité et du handicap. Les mécanismes par lesquels les infections aggravent les lésions cérébrales dans ce contexte ne sont pas élucidés. Notre projet cherche à répondre à cette question et à tester l'efficacité de deux médicaments (corticostéroïdes et anti-interleukine-1) pour la prévention des dégâts cérébraux liés aux infections.

Ce projet de 2 ans implique l'utilisation de 220 souris chez qui un AVCi sera provoqué en combinaison ou non à une infection bactérienne pulmonaire ou de la cavité abdominale. Les infections seront modélisées par l'administration, chez la souris anesthésiée, d'une molécule mimant les effets d'une infection bactérienne (le lipopolysaccharide). Cette molécule sera administrée soit par une injection intra-abdominale, soit par voie intranasale. Ne s'agissant pas d'une réelle infection bactérienne mais d'une molécule mimant les effets de bactéries, les souris ne nécessiteront pas de traitement antibiotique. Les traitements étudiés (corticostéroïdes et anti-interleukine-1) seront administrés en une prise par injection sous-cutanée, sous anesthésie, au moment de la réalisation de l'AVCi. La procédure totale (réalisation de l'AVCi, injection de lipopolysaccharide et du traitement étudié) est réalisée au cours d'une seule anesthésie générale d'une durée d'environ 60 minutes.

Les effets de ces infections sur les lésions cérébrales d'AVCi ainsi que l'efficacité des traitements visant à les contrer seront évalués de multiples manières : IRM cérébrale (une IRM 24h après la réalisation de l'AVCi, procédure réalisée sous anesthésie et durant 30 minutes environ), microscopie *in vivo* permettant d'étudier la microcirculation, études microscopiques post mortem des cerveaux de animaux, mesures sanguines et cérébrales de marqueurs d'activation du système immunitaire et de la coagulation.

A l'issue de l'évaluation par IRM réalisée 24h après l'AVCi, les souris seront euthanasiées.

Ce projet est construit en intégrant au maximum la préconisation des 3 R : Remplacer et Raffiner les modèles d'études actuels afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans les protocoles expérimentaux. Les procédures expérimentales ont été pensées pour utiliser le moins d'animaux possible, notamment par un calcul statistique du nombre de souris nécessaires réalisé a priori. Une analgésie avec de la buprénorphine sera réalisée systématiquement en per opératoire afin de limiter la douleur pour chaque procédure. Afin d'éviter et de réduire au maximum le risque de douleur des animaux, des points limites ont été définis associés à l'évaluation répétée des animaux par un score clinique et des échelles de douleur. En cas de score de déficit neurologique ou d'infection trop important, les animaux seront euthanasiés. En cas de score de douleur trop important, les animaux recevront une demi dose complémentaire de buprénorphine. Les animaux seront maintenus sans isolement, les cages seront équipées d'enrichissement afin d'éviter tout stress supplémentaire et l'entretien des animaux sera fait par des personnes compétentes et expérimentées.

Le recours à des expériences chez des animaux viendra en support de résultats obtenus précédemment dans des systèmes *in vitro* et dont l'efficacité biologique nécessite d'être vérifiée *in vivo*. L'objectif de notre étude est l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques efficace pour l'ischémie cérébrale aiguë avec une translation rapide à la recherche clinique. L'effet biologique des molécules utilisées sur leur cible a été démontrée *in vitro*. La démonstration de leur effet bénéfique thérapeutique avant transposition chez l'homme ne peut se faire que dans un modèle animal proche de la physiopathologie humaine. Les modèles murins d'AVC ischémique et d'infection post AVC permet de reproduire la physiopathologie des infections post AVC ischémiques chez l'homme.

13115 La stimulation cérébrale profonde d'une structure cérébrale (appelée noyau subthalamique) est devenue un traitement chirurgical de choix pour améliorer les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Ce traitement s'est aussi avéré efficace pour traiter les déficits cognitifs rencontrés dans des formes sévères de troubles obsessionnels compulsifs. Cette technique, cependant, engendre parfois des effets secondaires comportementaux chez les patients Parkinsoniens. Nous supposons que ces effets secondaires seraient dûs à un mauvais positionnement de l'électrode au sein des différents territoires fonctionnels du noyau subthalamique qui sont, à ce jour, mal identifiés. Ce projet vise donc à redéfinir ces différents territoires fonctionnels à l'aide de techniques électrophysiologiques et comportementales. Cette approche devrait ainsi permettre d'optimiser la stimulation cérébrale des patients parkinsoniens ou atteints de troubles obsessionnels compulsifs. Pour tester notre hypothèse, un maximum de 8 primates non humains seront inclus dans cette étude. Cet effectif a été réduit autant que possible mais est suffisant pour nous garantir l'obtention de résultats fiables (principe de réduction). Les animaux sont regroupés en fonction de leurs affinités, ils peuvent ainsi avoir des interactions sociales réconfortantes comme l'épouillage. Un

programme d'enrichissement du milieu est assuré par le zootechnicien référent. Il a pour but de familiariser les singes aux expérimentateurs, de leur apprendre à coopérer pour les déplacements et pour les soins et enfin il a aussi pour but de diminuer l'ennui que peut générer la captivité. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et sera évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (principe de raffinement). Ces questions seront donc appréhendées chez un modèle de parkinsonisme proche de la maladie humaine, au niveau d'un noyau subthalamique proche de celui de l'humain, nous permettant ainsi d'utiliser des électrodes à plusieurs contacts similaires utilisées chez le patient. Ainsi, nos résultats, de par la proximité entre l'humain et le primate non-humain, seront facilement transférables au patient, de sorte qu'il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou une simulation informatique (principe de remplacement). Ce projet préclinique vise donc à mieux comprendre le rôle neurophysiologique des différents territoires du noyau subthalamique dans l'élaboration des dimensions cognitive et motrice du comportement et de plus à optimiser l'efficacité de la stimulation cérébrale profonde pour les parkinsoniens et par là même envisager ce traitement pour d'autres indications.

13116 Avec une incidence de 2400 nouveaux cas par an en France, les tumeurs cérébrales les plus agressives dont le glioblastome sont la 3ème cause de décès par cancer chez l'adulte. Le traitement de référence consiste, lorsque cela est possible, à une exérèse chirurgicale de la tumeur, poursuivi par un traitement par radiothérapie et chimiothérapie. Cependant dans certains cas, ces tumeurs ne sont ni opérables, ni contrôlables par les thérapies classiques. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce contexte, la thérapie photodynamique (PDT) s'inscrit comme une stratégie complémentaire prometteuse pour améliorer l'éradication tumorale. La PDT est un traitement qui utilise des médicaments non toxiques à l'obscurité (appelés agents photosensibilisants ou photosensibilisateurs) en combinaison avec la lumière (apportée par une fibre optique) et l'oxygène pour tuer les cellules cancéreuses.

La finalité clinique de notre recherche est de proposer une nouvelle thérapie peu invasive pour le traitement des glioblastomes : la thérapie photodynamique interstitielle (fibre optique insérée au sein de la zone tumorale) anti vasculaire (ciblage et destruction des vaisseaux sanguins de la tumeur). Les nanoparticules utilisées en clinique (Phase II) pour l'imagerie (agent de contraste pour l'IRM) et le traitement des tumeurs cérébrales ont été fonctionnalisées avec un photosensibilisateur (pour réaliser le traitement PDT) et une molécule ciblant les vaisseaux sanguins de la tumeur afin de favoriser l'effet anti-vasculaire du traitement par thérapie photodynamique.

Une précédente étude nous a permis de valider chez l'animal la faisabilité du concept de la thérapie photodynamique interstitielle et d'optimiser les conditions de traitement. Des études *in vitro* (REPLACEMENT) ont permis de valider la stratégie de ciblage du réseau vasculaire de la tumeur ainsi que la potentialisation de l'effet vasculaire de la thérapie photodynamique.

Nous devons maintenant confirmer ces résultats *in vivo*. Le REPLACEMENT des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'efficacité des thérapies anticancéreuses dépend, chez l'animal comme chez l'Homme, de phénomènes complexes (inhérents à la physiopathologie cancéreuse d'une part, et, au comportement des nanoparticules en milieu biologique d'autre part) qui ne peuvent pas être appréhendés dans leur globalité sur des modèles cellulaires *in vitro*.

Dans ce cadre, l'étude préclinique sera réalisée sur 33 rats au maximum. Des méthodes non-invasives d'imagerie par IRM et par Tomographie par Emission de Positons (TEP) seront utilisées permettant de réaliser différents types d'examen, et de les réitérer dans le temps sur un même animal (REDUCTION). Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les rats seront anesthésiés dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie, traitement), et mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (RAFFINEMENT) : apparition d'altérations fonctionnelles, perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffes s'étalant sur plus de trois jours consécutifs, altération de l'aspect général de l'animal ou de son comportement, tumeur supérieur à 5 mm de diamètre.

13117 La greffe pulmonaire pulmonaire (TP) constitue le traitement de référence de l'insuffisance respiratoire terminale. Sa mortalité à 5 ans reste très élevée (près de 50%) par rapport aux autres greffes d'organes, notamment à cause de la dysfonction primaire du greffon (DPG). La DPG est un syndrome respiratoire aigu qui apparaît dans les 72 heures post greffe et est responsable d'une morbidité importante. Son incidence varie entre 20 et 60 % selon les séries. Les causes de la DPG sont multiples mais l'I/R pulmonaire et la dysfonction endothéliale qui lui est associée semble en être une des principales causes.

L'utilisation de la circulation extracorporelle (CEC) reste sujette à controverse actuellement pour son usage en routine en TP chez l'Homme. Pour certains, la réponse inflammatoire systémique qu'elle induit sur l'endothélium pulmonaire ne ferait que se surajouter aux lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) et contribuerait à majorer l'apparition de la DPG. Pour d'autres, elle permettrait d'optimiser l'oxygénation des poumons dans les heures suivant la transplantation et diminuerait l'incidence de l'œdème pulmonaire sévère dans le premier poumon transplanté, en contrôlant les pressions de reperfusion et en contre balançant la réponse inflammatoire. Toutes les études chez l'Homme sont contradictoires et il n'existe aucune étude randomisée contrôlée pour répondre à cette question. C'est pourquoi, des modèles chez le petit animal sont indispensables avant d'envisager une étude chez l'Homme.

Le projet est en accord avec le respect de la règle des 3R ; 1) Réduction : En effet, la multiplicité des analyses sur le même animal au cours de l'étude nous permettra de diminuer le nombre d'animaux nécessaire (nombre total = 120 rats) pour démontrer un effet significatif. Nous utiliserons des rats Wistars mâles de 300 à 400 grammes. De plus, Le nombre d'animaux nécessaire a été aussi calculé suivant une méthode statistique (ANOVA ONE-WAY) et en fonction des données sur le modèle de CEC chez le rat réalisées dans le laboratoire.

2) Raffinement : les animaux hébergés aux normes requises avec un enrichissement de leur milieu, auront 1 semaine d'adaptation avant l'intervention chirurgicale sans réveil, il n'y a pas de point limite mise en place. Les animaux sont anesthésiés avec de la Ketamine/Xylazine pendant toute la durée de la procédure, et ils sont monitorés sur une plaque chauffante.

3) Remplacement : cette partie du projet ne peut faire l'objet de remplacement par d'autres modèles alternatifs.

L'objectif de notre étude est donc de :

- Mettre au point un modèle d'ischémie-reperfusion pulmonaire chez le rat associé à une CEC.
- Evaluer l'impact de la CEC sur l'inflammation systémique, tissulaire et sur la dysfonction endothéliale pulmonaire chez le rat.
- Evaluer l'effet bénéfique probable de l'administration de l'Albumine pour le priming de la CEC.

13118 Le traitement de nombreux cancers reste encore très difficile voire inefficace et les méthodes traditionnelles n'ont pas encore apporté de réponses satisfaisantes sur le long terme. Ainsi, souvent, après plusieurs chimiothérapies qui pour la plupart apportent un bénéfice immédiat, la tumeur va recommencer à croître, avec la sélection de cellules résistantes au traitement et aboutissant à la mort du patient. C'est pourquoi s'est imposée, au sein de la communauté scientifique, l'idée qu'une seule méthode de traitement n'est pas suffisante pour guérir du cancer. Il existe ainsi une demande pressante de la part de l'industrie pharmaceutique pour l'identification de récepteurs spécifiques des cellules tumorales, permettant des approches de ciblage ou vectorisation d'agents d'imagerie et molécules thérapeutiques. Des partenaires de ce projet ont engagé le développement de peptides vecteurs (pVectors) conjugués avec des liposomes/nanoparticules (pVectors-NP) dans lesquels un agent cytostatique (ex : doxorubicine) est introduit et proposés comme potentiels candidat-médicaments. Nous poursuivons donc 2 objectifs scientifiques et technologiques principaux: i) le développement de nouveaux candidats-thérapeutiques afin d'améliorer la détection /suivi des cancers, ii) amener des candidats-médicaments aux phases précliniques de validation. Les objectifs principaux concernant le 1er point se déclinent en une procédure spécifique dans notre Demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques.

Des expériences sont ainsi envisagées chez l'animal (souris jeunes adultes) pour les procédures suivantes : Cancer Gastrique et Pancréatique.

Lors de précédentes études *in vitro*, nous avons pu démontrer le ciblage spécifique d'une première génération de nanoparticules vectorisées (pVector-NP) sur différents modèles cellulaires. Dans le présent projet, nous souhaitons utiliser ces mêmes vecteurs et des vecteurs optimisés (peptides différents, formulation nanoparticules différentes.) afin d'évaluer le potentiel de ciblage *in vivo*. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les protocoles expérimentaux. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Remplacement : Nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro*. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier la distribution de nos molécules d'imagerie dans des systèmes *in vitro* reproduisant la complexité des systèmes vivo (élimination, stabilité). Le modèle rongeur est indispensable à notre étude car il facilite le suivi des expérimentations, la gestion de la douleur, la faisabilité d'un groupe et il reste le modèle de choix pour la préclinique.

Réduction : Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : Dès leur arrivée les animaux seront placés en salle de stabulation pendant une semaine avant toute expérimentation. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en cartons et des petites maisons y seront disposées, hébergement en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites (état général, perte de poids, volume de la tumeur...) permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Des soins pré et post opératoires seront effectués lors de chaque expérimentation avec recours à l'anesthésie et analgésie lorsque cela sera nécessaire. Le personnel impliqué dans ce projet assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Le nombre d'animaux nécessaire (500 souris) pour ces études « Approche Thérapeutique », d'une durée totale de 5 ans, a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à des données de la littérature et à des études précédemment réalisées. Dans le respect de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement), le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences (une moyenne de 100 animaux par an, soit un nombre total et maximal de 500 animaux sur 5 ans). L'ensemble de ces paramètres sera affiné en fonction des premiers résultats obtenus afin d'ajuster au mieux le nombre d'individus nécessaires par étude et si possible réduire cette estimation.

13119 La greffe de peau ou transplantation cutanée est l'utilisation d'un morceau de peau pour recouvrir une plaie, soit dans un but de cicatrisation par le tissu apporté, soit comme pansement. Suivant l'origine du greffon on parle de prélèvement autologue (fait sur le receveur lui-même) ou de prélèvement hétérologue (fait sur une autre personne que le receveur). La xéno greffe désigne la transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. Elle s'oppose ainsi à l'allogreffe où le greffon vient de la même espèce que le receveur.

Les substituts cutanés, ou dermes artificiels, sont des biomatériaux capables de remplacer une partie de la peau et constituent une alternative précieuse pour la gestion des plaies lorsque les thérapies standards sont un échec. Cependant, sélectionner le bon substitut n'est pas une décision thérapeutique aisée. Aujourd'hui, si les greffes autologues sont les greffes de première intention pour la couverture des plaies, elles se heurtent à l'écueil d'une disponibilité limitée de peau, en particulier dans la prise en charge des grandes brûlures et les procédures restent invasives et douloureuses. Des allogreffes et des xéno greffes peuvent pourvoir au remplacement temporaire de

la peau, avant de laisser la place à une autogreffe. Subsistent évidemment les risques de rejet, douleurs et infection, et la formation de cicatrices.

De nombreux substituts cutanés biosynthétiques sont aujourd'hui disponibles. Ils sont constitués de cellules humaines vivantes ensemencées sur une matrice et nourries de protéines et des facteurs de croissance nécessaires pour mieux se développer et se multiplier dans le tissu souhaité. Ils sont utilisés pour traiter les plaies chroniques qui ne cicatrisent pas et pour les greffes de tissus mous chez les patients présentant des brûlures à épaisseur partielle (épaisseur partielle) ou des plaies chirurgicales, les ulcères du pied diabétique, les ulcères veineux... Il est donc important de tester de nouveaux substituts cutanés sur des modèles de plaies simples et chroniques représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation des plaies.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer différents substituts cutanés nouvellement développés afin de sélectionner celui ou ceux qui permettront de favoriser la régénération de tissu cutané sur un modèle murin de plaie.

Ce projet sera divisé en 2 parties afin tout d'abord de définir les conditions expérimentales optimales et ensuite de tester différents substituts cutanés, nécessitant l'utilisation d'un total de 120 souris mâles Swiss Nude de 20-22 g. Nous utiliserons des souris Nude pour éviter les risques de rejet.

Pour la 1ère partie, nous utiliserons 20 souris avec 4 conditions expérimentales différentes (5 souris par condition) : sous anesthésie gazeuse, suture chirurgicale ou non d'un anneau en silicone sur le dos pour éviter la contraction de la plaie (Procédure 1) avant l'induction de la plaie cutanée par excision cutanée au centre ou non de l'anneau en silicone (Procédure 2), suivi de la greffe d'un morceau de substitut cutané de référence dans le lit de la plaie cutanée avec ou sans suture chirurgicale, puis du placement d'un pansement au-dessus du greffon cutané, maintenu en place avec une bande de sparadrap (Procédure 3). Les greffes cutanées seront observées et photographiées chaque semaine pendant 4 semaines lors du change de pansement, après placement des souris sous anesthésie, afin d'évaluer la survie et la tolérance du greffon cutané (Procédure 4).

Pour la 2ème partie, nous utiliserons 100 souris, réparties en 5 groupes de 20 souris chacun, afin de tester 5 substituts cutanés nouvellement développés. Les conditions expérimentales seront définies en fonction des résultats de la 1ère partie (avec ou sans suture chirurgicale d'un anneau en silicone et avec ou sans suture chirurgicale du greffon cutané), et comprendront soit les 4 procédures expérimentales soit 3 des 4 (les 2, 3 et 4). Pour chaque substitut cutané testé, les souris seront mises à mort à différents temps après réalisation de la greffe cutanée, 3, 7, 14 et 28 jours, pour réaliser des analyses permettant d'évaluer les processus de régénération du tissu cutané au cours du temps (vascularisation et épithélialisation).

Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet mais permettant d'obtenir des résultats prédictifs et représentatifs (Réduction).

Les souris seront placées en cage individuelle (18. 9 x 29. 6 x 12. 8 cm) avec couvercle filtrant pour éviter qu'elles ne s'arrachent entre elles l'anneau en silicone, le greffon cutané, le pansement et la bande de sparadrap, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des bâtonnets d'ouate seront placés dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré une fois par semaine à chaque renouvellement de pansement, et si une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids maximal est observée ou si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (cachexie, vocalises, convulsions...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques.

A la fin de l'expérimentation, l'ensemble des animaux sera mis à mort par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique sous anesthésie gazeuse et un prélèvement cutané sera effectué au niveau de la zone de greffe cutanée pour la réalisation d'analyses biologiques.

Ce projet sera réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles *in vitro* ou *ex vivo* pour évaluer la tolérance et l'efficacité de substituts cutanés sur des plaies cutanées chroniques (Remplacement).

13120 Ce projet innovant vise à mieux comprendre la pathologie de la maladie d'Alzheimer. Celle-ci est caractérisée par la présence dans le cerveau des malades de nombreuses plaques amyloïdes dont le mode d'apparition et le rôle dans la pathologie sont débattus. La protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) a été identifiée, comme son nom l'indique, comme la source du peptide qui compose les plaques amyloïdes mais son rôle direct dans la maladie et le mécanisme menant à l'apparition des plaques sont mal connus.

Nous avons récemment observé que l'APP s'accumule autour des plaques amyloïdes. Nous souhaitons étudier le lien temporel entre ces accumulations d'APP et l'apparition de plaques amyloïdes. Ce projet permettra de tester cette hypothèse et donc de mieux comprendre la maladie et à terme d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La réalisation du projet est basée sur la modification génétique des neurones étudiés dans leur tissu natif (cerveau de souris), c'est-à-dire dans un contexte physiologique. Nous exprimerons le gène encodant la protéine APP fusionnée à une autre protéine fluorescente afin de suivre son devenir dans les neurones. Cette modification génétique sera réalisée grâce à l'utilisation de séquences d'ADN injectées dans les neurones du cerveau. Ces injections cérébrales auront lieu sur souris sous anesthésie et analgésie. Cette procédure sera suivie de la pose d'une fenêtre en verre (fenêtre crânienne) permettant la visualisation par fluorescence des neurones et des plaques amyloïdes au cours d'expériences de vidéo-microscopie.

Au total, 60 souris seront utilisées dans notre projet. Pour le respect de la règle des 3R, (1) la solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (imagerie chronique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux. (2) Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès le réveil de l'animal et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. (3) Les modèles de remplacement *in vitro* actuellement disponibles ne récapitulent pas les aspects neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer et ne permettent pas d'étudier fidèlement les mécanismes neurodégénératifs.

13121 La sclérose latérale amyotrophique (SLA), est une maladie du motoneurone tandis que la démence fronto-temporale (DFT) est un type de démence caractérisée par des troubles du comportement. Ces deux maladies, même si elles se caractérisent par des symptômes très différents, sont considérées comme un unique continuum physiopathologique. Des mutations dans les mêmes gènes sont associées à des formes familiales de SLA et de DFT, notamment dans le gène FUS. De plus, une partie des patients atteints de DFT présentent des inclusions de la protéine FUS sans avoir de mutations. Pour éclaircir le rôle de FUS dans ces deux maladies, un modèle murin exprimant une forme tronquée de FUS mimant les mutations humaines de FUS est disponible au laboratoire. Ce modèle murin présente une dégénérescence tardive et progressive des motoneurones, réminiscente de la SLA, mais aussi une atteinte corticale sévère et plus précoce, réminiscente de la DFT. Spécifiquement, nous avons observé une atteinte du système cholinergique central ainsi que des interneurones corticaux gabaergiques liés à la mutation de FUS. La nicotine est un agoniste des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. Ces récepteurs se retrouvent abondamment dans le système nerveux central, plus précisément sur des neurones cholinergiques ainsi que des interneurones corticaux gabaergiques. Sur la base de ces résultats, nous souhaitons tester une stratégie pharmacologique corrigeant ces défauts neurochimiques sur le phénotype comportemental de ce modèle. Pour cela, nous recherchons à moduler les systèmes

cholinergiques et gabaergiques avec un traitement à la nicotine. Nous proposons deux approches complémentaires, avec deux cohortes de souris différentes. Une première approche consiste en un traitement aigu où les souris recevront une injection intrapéritonéale puis seront soumises à des tests comportementaux. Pour l'étude du traitement aigu à la nicotine et dans la perspective du respect de l'approche des 3R, nous proposons un protocole utilisé en clinique humaine, appelé « cross over ». Ce protocole permet que chaque souris soit son propre contrôle, réduisant très fortement le nombre d'animaux nécessaires. Une deuxième approche consiste en un traitement chronique avec l'implantation de mini-pompes en sous-cutané, suivi des mêmes études comportementales. Afin de respecter le raffinement, les chirurgies seront réalisées sous anesthésie et analgésie. Des points limitant la souffrance de l'animal ont été établis et de l'enrichissement sera utilisé pour l'hébergement des animaux. Au total, ces deux protocoles utiliseront 256 souris. Les souris seront hébergées sous un environnement contrôlé (température et humidité constantes), et seront habituées et manipulées par un unique expérimentateur qualifié afin de diminuer au maximum tout stress occasionné par les procédures expérimentales. Etant donné les mécanismes étudiés ainsi que leur intégration dans des systèmes anatomiques complexes, il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles *in silico* ou *in vitro*. Les techniques que nous utiliserons dans ce projet sont déjà mises au point et utilisées de manière courante dans notre laboratoire et sont donc raffinées.

13122 Nous nous intéressons à la sclérodémie systémique (ScS), une maladie auto-immune rare (9/100000 habitants) et au pronostic vital sombre dans les formes sévères. Elle associe une vasculopathie sévère (atteinte des cellules endothéliales des petits vaisseaux), des anomalies immunologiques (présence d'auto-anticorps et de cellules immunes auto-réactives) et une fibrose touchant la peau et les organes internes. Les symptômes principaux sont la fatigue, le phénomène de Raynaud, la raideur au niveau des mains, les douleurs articulaires et la difficulté à former un poing. A ce jour, il n'existe aucune thérapeutique efficace contre la fibrose qui est responsable d'une altération profonde de la qualité de vie des patients et qui grève leur espérance de vie, notamment quand la fibrose touche les organes vitaux comme les poumons par exemple.

Nous travaillons en collaboration avec une société qui étudie l'anétholtrithione qui est une molécule déjà utilisée en clinique depuis de nombreuses années pour le traitement des syndromes secs buccaux (xérostomie). De nouvelles études leur ont permis de déposer un brevet pour le repositionnement de cette molécule dans des indications anti-ischémiques (traitement pour augmenter l'apport sanguin à un organe)

Le rationnel de cette étude repose sur :

- la démonstration faite de l'effet anti-ischémique de la molécule sur un modèle d'infarctus de la brebis
- la démonstration faite au laboratoire du lien entre vasculopathie et fibrose
- la réalisation d'une étude *in vitro* qui montrait que la molécule diminuait la production de collagène impliqué dans le phénomène de fibrose en situation d'hypoxie (mauvaise oxygénation du tissu).

Ces observations ont fait l'objet d'un dépôt de brevet sur l'utilisation de la molécule à visée anti-fibrotique au cours de la sclérodémie systémique.

L'objectif de cette étude est donc de montrer l'effet d'un traitement par la molécule sur une fibrose en cours de progression.

Pour réaliser cette étude nous demandons 240 animaux.

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

« Remplacer » les modèles animaux : Afin d'étudier l'effet d'une molécule potentiellement thérapeutique pour la ScS, l'utilisation de modèles murins de cette maladie est nécessaire et indispensable. En effet, il n'y a pas de méthode alternative dans la mesure où seul un modèle murin nous permettrait d'apporter la preuve de concept de l'intérêt de l'utilisation de cette molécule à des fins anti-fibrotiques chez les patients sclérodermiques. De plus les modèles murins de la ScS ont

de nombreuses caractéristiques comparables à la pathologie humaine, comme la fibrose cutanée, et permettront ainsi un transfert plus efficace de nos résultats aux patients.

« Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement dans la pathologie.

Raffiner «: Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte et suivi de leur naissance à leur mort afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux. Pour les injections les animaux seront anesthésiés dans une chambre contenant de l'isoflurane à 5%. Une fois les souris endormies, le taux d'isoflurane sera baissé à 2,5% pour les maintenir endormies. Elles seront suivies quotidiennement par le personnel de l'animalerie agréé qui leur apportera tous les soins nécessaires afin de limiter tout inconfort. De plus, chaque cage reçoit un enrichissement du milieu en l'occurrence des nids de « woodwool ».

13123 Le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminins avec 53 000 nouveaux cas recensés chaque année en France ; 1 femme sur 9 développe un cancer du sein au cours de sa vie. Il provoque le décès de plus de 11 000 personnes par an, ce qui en fait le cancer le plus meurtrier chez la femme.

Les anticorps (Acs) jouent un rôle important dans la défense du système immunitaire contre les agents pathogènes. Les Acs monoclonaux sont des outils thérapeutiques efficaces pour le traitement du cancer et des maladies auto-immunes notamment grâce à leur forte spécificité vis-à-vis de leur cible et à leurs propriétés pharmacologiques uniques. La plupart des Acs du répertoire immunitaire d'un individu sain sont dirigés contre des agents pathogènes. Cependant, une partie de ces Acs a la capacité de lier des petites molécules pro-inflammatoires, relarguées à l'extérieur des cellules lorsque celles-ci sont lésées. La capacité de ces Acs à interagir avec ces molécules pourrait être un mécanisme de régulation physiologique. Nous avons précédemment montré que la liaison de certaines de ces molécules aux Acs circulants a la capacité de conférer à ces Acs de nouvelles spécificités de liaison à l'antigène, et ainsi d'étendre leur potentiel de reconnaissance antigénique. Ce phénomène est corrélé à une augmentation de l'activité anti-inflammatoire des Acs. Le rôle physiologique de ce phénomène n'est pas élucidé.

Nous avons démontré *in vitro* que des Acs monoclonaux thérapeutiques utilisés actuellement en clinique pour le traitement de cancer peuvent se lier à ces molécules. Le Trastuzumab est un Ac humanisé anti-HER2, utilisé avec succès pour le traitement de cancer du sein HER2 positif. Nos résultats *in vitro* montrent que le Trastuzumab peut se lier à des petites molécules pro-inflammatoires et que cette interaction change son répertoire de reconnaissance antigénique. Nous avons également observé que cette liaison augmente l'activité cytotoxique du Trastuzumab sur une lignée de cancer du sein HER2 positive *in vitro*. Nos résultats nous incitent à étudier leur pertinence *in vivo*.

Dans le but d'évaluer le rôle de la liaison des petites molécules pro-inflammatoire sur l'efficacité thérapeutique du Trastuzumab, nous utiliserons un modèle murin de cancer du sein : des cellules de cancer du sein humaines HER2 positives seront injectées chez des souris immunodéficientes qui seront ensuite traitées par le Trastuzumab. Les résultats obtenus seront importants pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques avec les Acs monoclonaux.

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 155 souris de la lignée NSG-Hc. Pour la réalisation de cette étude, nous regrouperons les expérimentations dans le but de restreindre le nombre d'animaux pour les groupes contrôles. Nos études *in vitro* nous encouragent à poursuivre cette étude *in vivo* dans un modèle expérimental de cancer du sein, toutefois, l'étude sera interrompue si les expériences initiales invalident l'hypothèse de travail. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de

l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons).

13124 Les patients porteurs d'une mutation dans un gène de réparation de l'ADN, nommé XLF, sont microcéphales avec un retard de croissance notable ; certains présentent une polymicrogyrie (anomalie de l'organisation corticale des neurones). Le développement d'un modèle rongeur déficient pour le gène XLF pour étudier son rôle dans la réparation de l'ADN a mis en évidence des altérations au niveau de sous-populations cellulaires nécessaires à la neurogénèse.

Nous proposons de réaliser une série de tests comportementaux chez ces animaux afin de repérer un possible déficit mental (et/ou social). En raison de la similarité de structure du gène Paxx et d'une activité biologique redondante avec XLF, des animaux déficients pour le gène Paxx, seront testés en parallèle. La première analyse portera sur l'activité locomotrice des animaux par la mesure de la distance parcourue au cours d'un temps donné et par l'analyse de différents items comportementaux (nettoyage du pelage, immobilisation, redressement sur les pattes arrières) qui permettra de mettre en évidence ou non d'un défaut moteur. Nous analyserons ensuite leur susceptibilité au stress en utilisant un dispositif en croix surélevée qui nous permet de déterminer le niveau d'anxiété des individus testés. Leur sociabilité sera étudiée à l'aide du test de Crawley, dans lequel l'individu test peut circuler librement entre trois compartiments : l'un contenant un objet, l'autre un congénère et le dernier étant vide. Notre étude montrera si ces animaux mutés souffrent d'un déficit mental (et/ou social). Enfin, l'état dépressif des souris sera évalué par un test consistant à mesurer le temps de nage qu'une souris est capable d'effectuer sur une observation d'une durée maximale de 5 min.

Si cela est avéré, ce modèle pourrait aider à comprendre le rôle du gène XLF dans l'apparition des microcéphalies et/ou de l'autisme.

Le modèle rongeur se justifie car il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, aujourd'hui il n'existe pas de méthodes alternatives pour étudier le comportement animal nous permettant de répondre à la question posée.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des établissements reconnus. Leur nombre (150) a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences.

Le suivi quotidien des rongeurs, hébergés en groupe, garantira leur bien-être. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérience, afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

13125 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les virus oncolytiques, qui détruisent les cellules tumorales, sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication spécifique dans les cellules tumorales induisant leur destruction, avec une faible voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ».

La perspective de ce projet est d'évaluer et de comparer, dans différents modèles murins de tumeurs humaines, différents virus oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine. Cette évaluation se fera dans des souris qui seront préalablement pré immunisées ou non. Cette étude permettra de savoir si la pré immunisation est capable d'inhiber entièrement ou partiellement l'activité thérapeutique du virus oncolytique testé.

Les résultats de cette étude permettront ainsi de déterminer si l'efficacité anti-cancéreuse sera limitée chez des patients pré-immunisés et si l'efficacité d'injections répétées de virus sera limitée par le système immunitaire de l'hôte.

De plus, sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de la chimiothérapie standard ou de l'immunothérapie afin de potentialiser l'activité anti-tumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins, préalablement pré immunisés ou non, les combinaisons de ces virus avec des agents de chimiothérapies standards ou d'immunothérapie utilisés en clinique humaine pour le traitement de cancers de différentes origines. Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques en association avec des substances anti-tumorales couramment utilisées en chimiothérapie anti-cancéreuse et permettront d'adapter les traitements aux patients. Les résultats permettront également de valider chez l'animal l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques dans différents types de cancer.

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

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

-Remplacer : du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable. Un nombre maximal de 6240 souris est envisagé pour ce projet.

-Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce, tel que du matériel de nidification. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, avec eau et nourriture ad libitum. La réalisation par des techniciens rompus à ses manipulations garantit la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux.

Des doses non toxiques de sera seront injectées, ces doses seront définies suite à des recherches bibliographiques sur leur utilisation chez la souris.

Les procédures expérimentales seront arrêtées le plus précocement possible sur la base de critères généraux (poids, comportement des souris) et tumoraux (volume, localisation, aspect de la tumeur). Pour toute technique le nécessitant, une analgésie et / ou une anesthésie est prévue dans ce projet.

13126 Nous étudions l'influence de facteurs (facteurs de transcription) contrôlant l'expression de gènes important pour les programmes de production des cellules sanguines et l'impact de leur mutation dans les leucémies aigües.

Le sang est composé de globules rouges assurant la nutrition de l'organisme et des globules blancs assurant sa défense. Ces cellules sont en nombre contrôlé dans le sang et s'ajustent au besoin de l'organisme (hémorragie, infections etc...). Toutes les cellules sanguines sont produites à partir de cellules souches dans la moelle des os par un processus de différenciation (spécialisation) appelé hématopoïèse. Lors d'un besoin en cellule sanguine, les cellules souches reçoivent des signaux (facteurs de croissance) de cellules de la moelle, ces signaux sont intégrés par la cellule souche en modifiant l'allumage ou l'extinction de gènes (par les facteurs de transcription) responsables de la spécialisation des cellules souches en cellules sanguines. Les facteurs de transcription vont alors modifier complètement le programme génique (allumage ou extinction d'autres gènes, appelé gènes cibles) dans la cellule souche et ainsi permettre sa différenciation en globule blanc ou globule rouge. C'est ainsi que l'équilibre (qualité et quantité) des cellules sanguines est maintenu.

Cependant il arrive que ces facteurs de transcriptions soient altérés dans la cellule sanguine (mutation ou absence totale), les cellules en différenciation vont alors mal intégrer les signaux des

facteurs environnementaux et changer leur programme de différenciation. Ceci peut avoir plusieurs conséquences : la mort de la cellule, l'arrêt de cette différenciation ou une division anarchique de cette cellule mutée. Dans les deux premiers cas, il y a immunodéficience. La leucémie est une combinaison des deux derniers cas (blocage et division anarchique). La moelle est alors envahie de cellules non matures (blastes) incapables d'assurer leur fonction et la moelle ne peut plus créer de cellules sanguines entraînant la mort du patient.

Notre travail est de détecter les altérations des facteurs de transcription chez les patients leucémiques et de mimer ces altérations dans des souris pour mieux comprendre leur influence dans le processus cancéreux.

Après avoir déterminé *in vitro* quelles sont les altérations modifiant la spécialisation ou la multiplication des cellules sanguines, nous les mimons *in vivo* (chez la souris) pour vérifier si elles reproduisent la pathologie humaine. Nous avons sélectionné pour les études *in vivo* (grâce à nos résultats *in vitro*) un mutant induisant des leucémies aigües myéloblastiques et une mutation induisant des leucémies aigües lymphoblastiques chez l'Humain. Après avoir mis en place les modèles de souris, nous allons analyser l'apparition de la pathologie et étudier les organes touchés. Nous allons enfin essayer de comprendre comment la pathologie évolue et comment la bloquer pour développer des nouveaux traitements.

Nous respecterons la règle des 3"R": remplacement, réduction et raffinement. Pour cela nous prendrons les mesures suivantes:

Remplacement: Les expériences sur les souris ne sont faites qu'après avoir testé *in vitro* les différents mutants. Seuls les mutants ayant un intérêt biologique seront testés sur l'animal. Cette étape est nécessaire en cancérologie car il est crucial de connaître le devenir des cellules cancéreuses dans un organisme entier afin d'étudier les risques de métastases ou de rechutes après traitement.

Réduction: Les études sur l'animal sont réalisées après une étude bibliographique détaillée afin d'optimiser nos protocoles pour réduire au maximum le nombre d'animaux. Des études statistiques nous permettent également de déterminer le nombre minimum de souris nécessaires afin que l'expérience ait une valeur scientifique et n'est pas besoin d'être reproduite.

Raffinement: En plus des considérations éthiques, nous n'employons que des personnes formées à la manipulation des animaux et soucieux à chaque étape du bien-être de l'animal. Les conditions d'hébergements doivent être optimales en respectant les besoins primordiaux de l'animal (surveillance journalière sans stresser l'animal, non isolement et non surpeuplement des cages, changement très régulier de la nourriture, la boisson et la litière dans la cage). Les animaux sont surveillés quotidiennement par du personnel expérimenté afin de détecter les signes de souffrance. L'évaluation quotidienne de la souffrance nous permet de déterminer si l'expérience doit être arrêtée.

Les animaux seront observés tous les jours, dès le moindre signe pathologique (perte de plus de 20% du poids, prostration, poil hirsute etc..) les animaux seront sacrifiés par dislocation cervicale et analysés.

Points limites de l'étude: Perte de poids rapide (15 à 20% en quelques jours). Poil hérissé, dos rond, abdomen distendu ou léthargie spécialement si état débilité associé ou si le signe est prolongé (3 jours). Signes d'atteinte du SNC : inclinaison de la tête, tremblements, spasticité, convulsion, tourner en rond ou parésie notamment si le signe est associé à une anorexie. Paralysie. Croissance rapide d'une ou plusieurs masses, signes cliniques de leucémies. Automutilations persistantes. Lésions interférant avec l'abreuvement ou la prise de nourriture.

Ce projet de recherche est composé de 5 procédures différentes et nécessite l'utilisation de 5864 souris sur 5 années.

13127 Les tiques sont des arthropodes hématophages, qui se nourrissent donc de sang, sur des hôtes animaux et parfois humains, contribuant ainsi à la transmission de maladies infectieuses parfois sévères. Après les moustiques, elles sont en seconde position en ce qui concerne la transmission d'agents pathogènes, qui peuvent être viraux, bactériens ou parasitaires. Les tiques des animaux

de compagnie ou du bétail sont elles aussi porteuses de nombreux agents pathogènes, causant des maladies potentiellement graves chez l'animal mais pouvant infecter l'homme. Pour ces différentes raisons, ces arthropodes sont un axe d'étude majeur en entomologie car ils constituent premièrement un élément de suivi des maladies infectieuses vectorisées mais aussi leur premier moyen de lutte. Bien que beaucoup des maladies bactériennes transmises par les tiques soient traitées aisément par antibiotiques, celles-ci, comme les maladies virales sont parfois ignorées car peu connues des non-spécialistes. La lutte contre le vecteur reste donc la meilleure option.

Pour mieux étudier les tiques, leur développement et leurs interactions avec les pathogènes, il faut pouvoir les élever en laboratoire. Beaucoup d'arthropodes hématophages sont maintenus en laboratoire grâce à des systèmes de nourrissage artificiels sur membrane qui sont bien adaptés pour des repas rapides. Les tiques adultes en revanche prennent des repas sanguins de 3 à 4 semaines qui ne sont pas du tout adaptés à ce genre de système puisque le sang coagulerait dans l'appareil. Des alternatives ont été proposées dans des systèmes de plaques à puits couvertes avec des membranes très élaborées à composer soi-même ; le coût et le temps ne sont pas adaptés à un insectarium qui élève plusieurs centaines de tiques. Et ce système ne s'est pas prouvé fiable sur plusieurs générations. Pour ces raisons, l'utilisation d'un animal est nécessaire pour maintenir les élevages de tiques de façon stable. Cette méthode a été déjà développée sur oreilles de lapin New Zealand. Trois espèces de tiques seront élevées dans notre laboratoire et chaque espèce ne pourra être maintenue sur lapin qu'un an. En effet, les animaux développent des anticorps contre la salive de tique qui empêche un gorgement satisfaisant et dans de bonnes conditions pour une durée supérieure. Etant donné que le projet sera approuvé pour 5 ans, cela nous fait un total de 15 lapins. Nous comptons une marge de 5 animaux supplémentaires dans le cas où une procédure devrait être arrêtée prématurément ou si une nouvelle espèce de tique était introduite en élevage dans notre insectarium. 20 lapins seront donc inclus dans ce projet.

Les lapins femelles sont hébergés individuellement en raison de leur agressivité avec leur congénaires mais dans la même pièce qui est calme tout au long de la journée. Elles sont visitées chaque jour, y compris week-end et jours fériés par du personnel habilité. Chaque cage est équipée d'une plate-forme et d'une cachette, ainsi que de palets à ronger. La souffrance animale est contrôlée pendant et après la procédure expérimentale. Un onguent ophtalmique est appliqué pendant l'anesthésie et les animaux sont attentivement surveillés après le gorgement des tiques. Toute manifestation d'inconfort sera soulagée par l'application d'un spray anti-démangeaisons et tout signe de douleur entraînera l'arrêt de la procédure.

13128 Dans le système nerveux, les cellules nerveuses ou neurones sont connectées entre elles et communiquent grâce à des molécules appelées neurotransmetteurs. La connexion entre les neurones s'appelle la synapse au niveau de laquelle le neurotransmetteur est libéré et agit comme une clé dans une serrure. En effet, il va pouvoir se fixer sur des molécules capables de le reconnaître, insérés dans la membrane du neurone. Ces molécules sont appelées récepteurs aux neurotransmetteurs. La force de la connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones connectés. Cette propriété qu'ont les synapses de changer leur efficacité est appelée plasticité synaptique. Elle est à la base de nombreuses formes de mémoire simples ou complexes permettant l'adaptation par des changements de comportements en réponse aux changements de l'environnement chez tous les individus présentant un système nerveux. L'étude du fonctionnement des récepteurs et de la plasticité synaptique est donc importante pour comprendre les mécanismes des différents types de mémoires et de leurs perturbations. Notre groupe a montré dans des modèles *in vitro* de neurones de rongeurs en culture que, pour pouvoir changer l'efficacité d'une synapse, les récepteurs aux neurotransmetteurs ont des mouvements latéraux très rapides dans la paroi des neurones, ce qui leur permettent d'être sollicités très vite. Il a montré ainsi qu'en immobilisant les récepteurs avec des molécules particulières (comme des anticorps par exemple), la synapse perdait sa capacité à changer son efficacité et produire une réponse modulée. Il est maintenant important d'évaluer et de comprendre l'effet de l'immobilisation de certains types de récepteurs sur la plasticité synaptique en développant une nouvelle génération d'outils moléculaires chez un modèle animal proche de l'être humain, la

souris. Cette espèce est un mammifère, facile à élever et à reproduire dans des conditions contrôlées. Très utilisé en neurosciences car son cerveau a une organisation proche de celle de l'homme. Il est capable d'apprendre vite des tâches comportementales complexes.

Dans ce projet les souris utilisées sont des souris transgéniques sans un phénotype dommageable. Ces souris génétiquement modifiées nous permettent la manipulation des récepteurs afin d'étudier plus en détail l'importance de la mobilisation de certains sous-types de récepteurs sur la plasticité synaptique.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, à ce jour il n'existe pas d'autres méthodes alternatives à l'étude de l'effet de l'immobilisation des récepteurs dans la plasticité synaptique sur des coupes du cerveau.

Réduire: le nombre d'animaux est calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de donnée permettant d'atteindre une signification statistique. Le nombre d'animaux est de 190 sur 5 ans. Chaque groupe expérimental est accompagné d'un groupe contrôle.

Raffiner: Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes sont mises en place: Les animaux proviennent d'un éleveur agréé. À leur arrivée, les animaux sont hébergés en cages collectives, garnies de litières leur permettant de reproduire un comportement naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons, pour leur permettre de construire des nids et de jouer et de ronger. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. Après un premier contrôle de leur état de santé, les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation. Les animaux sont surveillés quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie.

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

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

13129 La forme congénitale de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss est une maladie génétique affectant les muscles squelettiques et cardiaque, mais aussi des problèmes métaboliques, réduisant drastiquement l'espérance de vie des personnes atteintes. A l'heure actuelle, les traitements sont uniquement palliatifs.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de développement de la maladie et de tester des approches thérapeutiques innovantes, des modèles de souris ont été créés, qui ont déjà démontré leur validité. En effet, dans le modèle murin reproduisant la forme sévère de la pathologie, les souris homozygotes développent une atteinte métabolique, musculaire et cardiaque avec une mort prématurée à l'âge de 2 semaines, tandis que les animaux hétérozygotes présentent une atteinte cardiaque isolée et meurent vers l'âge de 1 an. Les mécanismes sous-jacents commencent à être mieux compris. Il a notamment été mis en évidence : 1) une diminution de l'expression de la protéine ainsi que 2) un effet toxique de la protéine mutée.

Dans ce contexte, le présent projet vise à tester l'efficacité de deux approches de thérapie génique visant 1) à augmenter l'expression de la protéine normale en surexprimant le gène (2 constructions différentes) et 2) à augmenter l'expression de la protéine normale tout en réduisant l'expression de la protéine mutée toxique (6 constructions différentes comprenant notamment des constructions servant de contrôle positif et de contrôle négatif). Les différentes constructions sont empaquetées dans des virus afin de pouvoir se propager de manière large dans les différents organes des souris. L'évaluation de l'efficacité des différentes molécules est en cours de finalisation dans des cellules musculaires en culture provenant de modèles de souris mais aussi des patients. Les molécules les plus efficaces (et les molécules contrôles) seront testées *in vivo* sur notre modèle murin.

Les tests *in vivo* comprennent 3 étapes :

1. La première étape correspond à l'injection intramusculaire de souris hétérozygotes pour la mutation âgée de 2 mois. L'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité des molécules sera réalisée 2 mois post-injection. Cinq souris par construction (8 constructions) seront ainsi injectées, soit 40 souris. Les molécules qui auront démontré leur efficacité et leur innocuité (maximum 4) passeront à la deuxième étape. Total de 40 souris maximum.

2. Cette deuxième étape consiste à l'injection des virus dans l'organisme entier. Les animaux seront injectés à l'âge de 2 ou 3 jours au niveau de la veine temporale. Tous les animaux de la portée seront analysés (mâles et femelles, tous les génotypes). Les animaux homozygotes seront suivis quotidiennement pour analyser leur survie (n=5). Les animaux hétérozygotes (n=10) et sauvages (n=5) seront suivis en échographie tous les mois à partir de l'âge de 4 mois avant leur euthanasie et prélèvement de leurs tissus lorsque la fraction d'éjection sera passée sous le seuil de 20%. Total de 80 souris maximum.

3. Dans une dernière partie, tous les animaux des portées seront injectés à l'âge de 2 ou 3 jours dans la veine temporale. Tous les animaux homozygotes (n=5 par construction) seront sacrifiés 3 à 4 jours avant la date de décès la plus précoce constatée dans l'étude de survie afin de prélever les tissus pour analyses. Toutes les souris sauvages (n=5) et hétérozygotes (n=10) injectées seront sacrifiées au même âge pour effectuer les analyses biologiques « à court terme ». Total de 80 souris maximum.

En tout, 200 souris sont ainsi prévues si toutes les constructions sont testées.

Après les différentes études préliminaires réalisées *in vitro*, le recours à un modèle animal est indispensable à l'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité de cette approche thérapeutique. Le modèle murin de la pathologie est très bien caractérisé et reconnu par la communauté scientifique.

Cette étude est réalisée en 3 étapes. A chaque étape, l'efficacité et l'innocuité des différentes approches thérapeutiques sont évaluées et seules les constructions réunissant les 2 paramètres passeront à l'étape suivante, ce qui permettra éventuellement de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, le nombre de 200 souris est potentiellement surestimé. D'autre part, tous les animaux créés pour les étapes 2 et 3 (mâles et femelles et tout génotype) seront analysés, donc pas de production d'animaux surnuméraires pour ces parties.

La personne en charge du projet est expérimentée pour les injections intramusculaires et intraveineuses. Les animaux sont toujours anesthésiés avant injection et avant sacrifice. De plus, les souris sont suivies quotidiennement dans la semaine suivant les injections puis de manière bihebdomadaire. Les souris sont euthanasiées si elles présentent des signes de souffrance.

13130 La morphine atténue les douleurs. Cependant, un traitement chronique à la morphine provoque une tolérance à l'analgésie. Il y a alors une diminution des effets de la morphine qui entraîne la nécessité d'augmenter les doses pour obtenir un effet équivalent. La tolérance est un phénomène complexe et fait intervenir des phénomènes adaptatifs localisés dans le système nerveux central. L'inactivation des récepteurs à la morphine et leur implication dans la tolérance sont étudiées depuis de nombreuses années au niveau moléculaire. Cependant, aucun traitement thérapeutique préventif n'a été développé jusqu'à présent. De manière surprenante, 25% des souris consanguines traitées à la morphine ne développent pas de tolérance. Une telle constatation laisse entrevoir une possibilité de traitement se basant sur les différences entre les souris devenues tolérantes et celles qui sont résistantes à l'apparition de la tolérance.

Notre projet permettra d'étudier *in vivo* les modifications des taux de neurotransmetteurs engendrées par la tolérance à la morphine chez des animaux tolérants et réfractaires à la tolérance morphinique en plus d'approcher plus en détail les mécanismes moléculaires de la tolérance. Nous nous focaliserons sur la substance grise périaqueducule (PAG) qui est un des points de contrôle majeur de l'intégration douloureuse. Pour ce faire, nous utiliserons quatre cohortes de souris qui recevront soit une injection unique de morphine ou de solution saline (contrôle correspondant à un traitement ponctuel), soit une injection répétée de morphine ou de solution saline (contrôle correspondant à un traitement chronique) durant 10 jours. La mise en évidence d'une différence ou

d'une adaptation physiologique suite à un traitement chronique pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques majeures pour le management des opioïdes.

Ce projet utilise un modèle validé d'induction de la tolérance à la morphine. L'effet analgésique sera déterminé à l'aide d'un test de nociception basé sur le réflexe de retrait de la queue lorsque celle-ci est placée dans une eau à 47°C. Ce test, qui détermine le seuil de sensibilité nociceptif thermique, est considéré comme peu douloureux puisque l'animal peut retirer sa queue dès qu'il ressent une douleur. L'implantation d'une canule de microdialyse dans la substance grise périaqueducale permettra de recueillir du fluide extracellulaire (matériel réellement sécrété en continu) de manière régulière au cours des expériences d'induction de la tolérance à la morphine.

Etant donné que les souris femelles possèdent des susceptibilités différentes à la morphine, les mêmes expériences seront réalisées sur des souris femelles.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Les modèles de culture cellulaire se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés, la notion de tolérance étant uniquement visible et détectable chez l'animal par un test de comportement spécifique. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire.

Réduire : Un total de 130 souris mâles et 130 souris femelles sera utilisé lors de ces études. Ce nombre correspond au nombre minimal d'animaux par groupe permettant de mettre en évidence la sous population de 25% des souris réfractaires à la tolérance morphinique.

Raffiner : Afin de réduire au minimum le stress et la douleur, la pose de la sonde de microdialyse sera réalisée après injection préopératoire de buprénorphine, suivie d'une anesthésie profonde à l'isoflurane (gaz) et d'une injection sous cutanée locale de xylocaïne. Une analgésie post-opératoire (métacam) dans l'eau de boisson sera mise en place pendant 3 jours. En cas de souffrance post-opératoire persistante, de la buprénorphine sera administrée sur une période de 48h. Les animaux sont d'abord placés en cage de 5 animaux. Ils seront maintenus dans un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie). L'eau et la nourriture seront disponibles ad libitum. Les souris seront placées en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlée. Il n'est attendu aucun stress chez les animaux requis lors cette étude.

Un nombre total d'animaux à tester de 260 souris mâles et femelles a été établi et se base sur les approches nécessaires au projet.

13131 Le glomérule est l'unité spécialisée dans l'ultrafiltration du plasma pour l'élaboration de l'urine primitive dans le cortex rénal. Les podocytes (cellules du glomérule) et leurs pédicelles (prolongements) forment un premier maillage pour obtenir cette urine primitive. Lorsqu'un dysfonctionnement des podocytes et pédicelles apparaît, le syndrome néphrotique s'installe. Celui-ci est présent dans différentes pathologies comme le diabète, le syndrome néphrotique idiopathique et d'autres pathologies caractérisées par une glomérulosclérose focale segmentaire. Cette néphropathie est caractérisée par une protéinurie qui induit un œdème et une hyperlipidémie (augmentation des lipides dans le sang).

La puromycine aminonucléoside (PAN) est une toxine podocytaire qui entraîne la fusion et la perte de pédicelles. Les modifications morphologiques des glomérules observées chez le rat traité avec le PAN sont alors proches de celles observées chez l'homme. Le traitement de la pathologie aiguë est le plus souvent réalisé par des corticoïdes ou en cas d'échec par des immuno-suppresseurs. Dans la pathologie chronique où la glomérulosclérose et la fibrose sont installées, les traitements actuels permettent de ralentir l'avancée de la pathologie mais pas de réparer les dommages. En dernier recours il y a le remplacement du rein qui a cessé de fonctionner.

Pour cette raison, l'efficacité des traitements préventifs ou curatifs reste un enjeu majeur pour la recherche pharmacologique. L'objectif de ce projet est de pouvoir évaluer l'effet de molécules de référence et/ou candidats médicaments sur la perte de fonction et sur les dommages glomérulaires. Actuellement, les méthodes alternatives permettant une telle évaluation sont inexistantes. De ce

fait, ce déficit rend incontournable le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments sur la perte de fonction et sur les dommages glomérulaires.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 900 rats à raison de 15 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou de doses à tester.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement de l'hébergement (type play tunnel en polycarbonate, aspen brick) sera introduit auprès de ces derniers. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours afin de déceler l'apparition de points limites (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...), comportements atypiques (vocalisation, prostration, agressivité...), une perte de poids >20% du poids en début d'expérimentation associée à une prostration pendant plus de 48h. Les analyses portant sur l'urine et le sang, l'animal est son propre contrôle permettant de réduire et de raffiner le nombre d'animaux. De plus, toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sur plaque chauffante afin de maintenir la température corporelle de l'animal. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

13132 La dystrophie myotonique de Steinert (ou DM1) est une pathologie génétique, dominante, touchant 1 personne sur 8000 en France, elle est caractérisée notamment par une faiblesse musculaire, une myotonie, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence et des anomalies cognitives et du comportement. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie.

Jusqu'à présent, ce sont principalement les altérations musculaires et cardiaques qui ont été étudiées. Or, le cerveau présente également des modifications significatives révélées par imagerie par exemple. Afin d'étudier cette maladie au niveau cérébral, nous utiliserons un modèle reconnu de lignées de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1, présentant chacune des caractéristiques proches des différents symptômes humains.

Nous étudions plus particulièrement le glutamate, qui est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central et dont les protéines de régulation (appelées transporteurs) ont des taux altérés à la fois chez les patients et les souris mutées DM1. Le projet de recherche fondamentale que nous menons depuis deux ans vise à évaluer la capacité de ces transporteurs cérébraux, moins exprimés et donc moins nombreux, à réguler les taux extracellulaires du glutamate de ces souris. Nous nous intéressons plus particulièrement à deux structures cérébrales impliquées l'une et l'autre dans les déficits intellectuels, mais aussi riches en neurones à glutamate : le cortex frontal et l'hippocampe dorsal. Comme des études antérieures effectuées post-mortem sur des patients DM1 ont montré que la capacité des transporteurs à glutamate serait déficiente et que nos premières données chez la souris le suggèrent également, l'effet d'un traitement pharmacologique connu pour stimuler la synthèse de ces transporteurs sera aussi évalué dans l'une de ces deux mêmes zones cérébrales.

Les résultats de notre étude devraient permettre de mieux connaître les conséquences cérébrales de la mutation génétique mais aussi d'évaluer une nouvelle piste médicamenteuse pour cette pathologie rare.

Notre étude consiste à utiliser des procédures de la littérature reconnues et réalisées dans le respect de l'éthique animale. Cent quarante-quatre souris (144 au maximum) seront utilisées sur les trois années que durera ce projet qui étudiera deux structures cérébrales avec trois lignées différentes (deux lignées avec mutation et une saine), en présence ou en absence d'un traitement pharmacologique visant à restaurer la capacité de transport du glutamate. Nous sommes en fin de 2e année de projet et le nouveau traitement pharmacologique sera testé sur l'animal en année 3 et correspond à notre demande d'avenant au projet déjà validé. Comme nous l'avons fait pendant les deux premières années du projet, nous réduirons le plus possible le nombre d'animaux utilisés en nous basant à la fois sur nos résultats déjà obtenus et les tests statistiques. Nous garderons nos animaux dans des conditions d'hébergement et d'asepsie appropriées et nous veillerons à leur fournir une nourriture adaptée à leur handicap (exemple : nourriture réduite en poudre pour en

faciliter la prise) et nous utiliserons les stratégies expérimentales les plus adaptées pour minimiser leur souffrance qui relèvera d'une sévérité modérée. Nous mettrons en place un suivi clinique quotidien des animaux avant, pendant ou après le traitement pharmacologique qui devrait permettre d'observer une amélioration des déficits induits par la pathologie génétique.

13133

> Contexte scientifique

Les pathologies cérébrales et en particulier les maladies neurodégénératives sont un problème majeur de santé publique pour les pays développés. En Europe, ces pathologies représentent un fardeau économique d'environ 387 milliards d'euros par an. La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire autosomale dominante. En France, environ 12 000 patients en sont actuellement atteints, et environ 6 000 personnes développeront la maladie au cours des 20 prochaines années. Ces patients décèdent généralement 15 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes car il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour prévenir ou retarder la progression de la maladie. La physiopathologie de la maladie de Huntington est principalement décrite par des signes neurologiques, psychiatriques et moteurs, mais elle touche tous les organes, y compris les muscles squelettiques. Les patients souffrent en effet d'une perte de masse musculaire associée à une faiblesse musculaire (perte de force, fatigabilité accrue) au stade terminal de la maladie. Cette maladie génétique est liée à la fois au déclin de la protéine normale huntingtine et à l'expression d'une protéine mutée. L'huntingtine est exprimée dans les neurones et dans le reste du corps, notamment dans le muscle squelettique. Il a été rapporté que l'absence totale d'huntingtine chez la souris est létale dès la naissance. Afin d'étudier le rôle de l'huntingtine dans le muscle, un modèle murin (souris HSA-Htt-KO) a été développé dans lequel la protéine est absente uniquement dans les muscles squelettiques ce qui a pour conséquence le développement d'une myopathie légère. Bien que ce modèle ait été parfaitement caractérisé d'un point de vue moléculaire, les répercussions fonctionnelles de l'absence d'huntingtine n'ont jamais été étudiées. Cette étape est toutefois indispensable pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

> Objectif du projet

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre le rôle physiologique de l'huntingtine dans le muscle squelettique en réalisant l'exploration fonctionnelle du muscle de souris HSA-Htt-KO dans des conditions physiologiques. Nous allons pour cela analyser le métabolisme énergétique musculaire (capacité oxydative, quantifications des composés phosphorylés de haute énergie impliqués dans l'activité musculaire) en relation avec les performances musculaires (fatigabilité, capacité à produire la force), et ce, de manière totalement non invasive et indolore grâce aux méthodologies d'imagerie et spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) *in vivo* sur souris vivantes anesthésiées.

> Conformité de la règle des 3R

Le recours aux animaux est indispensable pour ce projet car les mesures au niveau du métabolisme énergétique et des performances mécaniques seront faites sur des individus présentant une déficience en huntingtine musculaire ainsi que les symptômes de la maladie de Huntington, et cette démarche ne peut pas être réalisée chez l'homme. Par ailleurs, les critères métaboliques et fonctionnels que nous allons étudier sont de types physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer l'étude chez l'animal vivant. Toutefois, nous n'utiliserons que le nombre de souris nécessaires pour l'exploitation statistique des données, à savoir 40 individus (20 souris de type C57BL/6 et 20 souris de type HSA-Htt-KO).

Concernant le raffinement, les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation (coton), d'abris en plastique permettant aux animaux de se cacher, d'un disque d'exercice, et de bûchettes de bois destinées à être rongées. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies *ad libitum*. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine. Par ailleurs, l'utilisation de la RMN sur animaux anesthésiés par inhalation gazeuse permettra de par son caractère non invasif et

totallement indolore de réduire le stress des animaux. La RMN réduira également le nombre d'animaux utilisés car elle permettra d'obtenir pour chaque animal des mesures du métabolisme énergétique dans différentes conditions (repos, activité musculaire, récupération post-activité) au cours d'un seul examen, contrairement aux techniques classiques de biochimie qui auraient nécessité de sacrifier des cohortes d'animaux pour chacune de ces conditions afin de réaliser des dosages métaboliques sur biopsies musculaires. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation de la douleur par score avec indices de 0 (normal) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux, et des actions seront à mener en fonction des scores obtenus (état normal pour des scores de 0 à 3 ; surveillance rapprochée obligatoire pour des scores de 4 à 8 ; souffrance sévère avérée impliquant l'arrêt immédiat du protocole et l'euthanasie de l'animal pour des scores supérieurs à 8). A la fin de l'étude, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale induite par inhalation d'isoflurane afin de réduire au maximum leur douleur et leur détresse.

> Conclusion

Ce projet permettra de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles des altérations musculaires liées à l'absence d'huntingtine, ce qui sera utile pour toute la communauté scientifique en permettant notamment à terme la mise au point d'approches thérapeutique contre la maladie de Huntington.

13134 L'objectif de cette étude est de mieux comprendre le rôle physiologique des co-transporteurs lactate proton de type MCT1 dans le muscle squelettique. Le lactate est un substrat énergétique important lors de l'activité musculaire, et des accumulations importantes en protons (un phénomène qui provoque une diminution du pH, et donc une acidose, dans la cellule) et en lactate sont considérées comme néfastes pour l'activité musculaire. De ce fait, MCT1 occupe une place centrale dans le fonctionnement du muscle étant donné qu'il intervient dans le transfert du lactate et des protons depuis l'intérieur de la cellule musculaire vers le sang. Toutefois, bien que MCT1 ait été parfaitement caractérisé d'un point de vue biochimique et enzymologique, son rôle physiologique dans le muscle en activité demeure très peu étudié et les quelques résultats expérimentaux qui ont été obtenus sont contradictoires. L'étude de l'implication de MCT1 dans la production d'énergie et dans la régulation du pH au cours de l'effort ainsi qu'en réponse à un entraînement en endurance devrait fournir des éléments précieux pour une meilleure compréhension de la fonction musculaire dans des conditions normales et physiopathologiques (drépanocytose, hémoglobinopathie, myopathie).

Design de l'étude : Nous allons utiliser un modèle de souris génétiquement modifiées appelé MCT1+/- . Ce modèle, qui est parfaitement viable et présente un faible contenu de MCT1 dans les cellules musculaires comparé à des souris contrôles, nous donne l'opportunité d'explorer directement le rôle de MCT1 *in vivo* dans le métabolisme énergétique au repos, à l'exercice et en réponse à un entraînement en endurance. L'exploration du métabolisme énergétique sera réalisée au moyen de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 (SRM du P31). Cette technique offre la possibilité de mesurer *in vivo* le pH intracellulaire et les concentrations des principaux composés phosphorylés (ATP, phosphocréatine, ADP, phosphate inorganique) impliqués dans le métabolisme énergétique, ceci de façon simultanée, non invasive et en continu lors de protocoles expérimentaux consistant en la succession de périodes de repos, d'exercice musculaire et de récupération. Les souris seront analysées avant et après la période d'entraînement.

3R : Nos travaux se dérouleront donc dans le strict respect de la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner). En effet, l'utilisation de la SRM du P31 permettra, de par son caractère non invasif et totallement indolore, de réduire le stress des animaux. La SRM du P31 réduira également le nombre d'animaux utilisés car elle permet d'enregistrer des cinétiques métaboliques chez les mêmes individus, contrairement aux techniques classiques de biochimie qui auraient nécessité de sacrifier des cohortes d'animaux aux différents temps de la cinétique afin de réaliser des dosages métaboliques sur biopsies musculaires. De plus, nous n'utiliserons que le nombre de souris nécessaires pour l'exploitation statistique des données, à savoir 40 individus en tout (un groupe de

20 souris MCT1+/- sera comparé à un groupe de 20 souris contrôles). Ces mêmes souris seront utilisées pour suivre un entraînement en endurance afin d'étudier le rôle de MCT1 en réponse à cette intervention. Ces expérimentations seront effectuées sous anesthésie générale, associé à du gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement oculaire. La température de la souris sera gardée stable à l'aide d'une couverture chauffante et observée à l'aide d'une sonde rectale insérée à l'aide de gel lubrifiant. Le réveil des souris sera effectué en cage individuelle sous lampe chauffante avant d'être remis avec ses congénères. Par ailleurs, il est important de préciser que les critères métaboliques et fonctionnels que nous allons étudier sont de types physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer l'étude chez l'animal vivant.

Gestion du bien-être animal : Toujours dans le respect de la règle des 3R, les expériences seront réalisées dans une pièce à l'écart de la salle d'hébergement par des manipulateurs formés au bien-être animal. De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal : un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux (perte de poids, vocalisation importante, poils hérissés, prostration, blessures, infections cutanées). Le protocole sera arrêté pour tout animal obtenant un score supérieur ou égal à 2 dans deux de ces catégories. Les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation (coton), d'abris en plastique permettant aux animaux de se cacher, et de bûchettes de bois destinées à être rongées. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine.

13135 Le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme est assuré par un dialogue métabolique entre les différents organes. Certains métabolites peuvent en effet être produits par un organe et utilisés comme substrats par d'autres. Nous pensons que les tissus adipeux jouent un rôle fondamental dans la distribution des flux métaboliques à l'échelle de l'organisme. Les tissus adipeux de type brun sont en particulier très consommateurs de substrats énergétiques : glucose, acides gras mais aussi d'autres moins décrits tels que le lactate et les corps cétoniques. Tout dysfonctionnement des tissus adipeux de type brun (au cours des maladies métaboliques associées à l'obésité ou lors du vieillissement) pourrait induire une re-distribution des flux métaboliques à l'échelle de l'organisme, ce qui pourrait avoir des conséquences notables sur le métabolisme, le fonctionnement des différents tissus, ainsi que sur l'équilibre énergétique de l'organisme entier. Une approche expérimentale permettant d'étudier les flux de métabolites *in vivo* est donc nécessaire pour tester notre hypothèse.

Avant de réaliser une étude approfondie sur les différents modèles de souris dont nous disposons, nous souhaitons réaliser une étude pilote. Celle-ci nécessite de travailler sur 54 souris de génotype standard afin de mettre au point et de raffiner les différentes procédures: chirurgie, perfusion sur animal vigile, méthode de prélèvement.

L'ensemble des fondements de la règle des 3R est appliqué :

- Notre projet consiste à étudier les flux métaboliques entre différents tissus. Bien qu'un volet de notre projet ait déjà été réalisé sur des cellules cultivées, aucune technique de remplacement du modèle animal n'existe à ce jour. Il s'agit d'une étude intégrée à l'échelle de l'organisme impliquant des échanges de métabolites entre différents tissus ayant des spécificités bien distinctes. Le recours à l'animal est donc indispensable pour ce projet de recherche.

- Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un travail de raffinement qui devrait nous permettre de préserver au maximum le bien-être des animaux tout au long des procédures. De plus le caractère grégaire des souris sera maintenu puisque les animaux ne seront jamais seuls en cage (sauf au moment de la perfusion) grâce à un dispositif empêchant les souris d'abimer le cathéter ou de s'automutiler. Nous proposons aussi d'enrichir l'environnement des souris, favorisant le bien-être de l'animal.

Une surveillance des souris sera réalisée au cours des différentes procédures, ceci permettant d'euthanasier les animaux ou de les écarter du protocole en cas de comportements anormaux ou de souffrance. Les points limites sont : perte de poids rapide (20% en quelques jours), prostration, poil hirsute, dos rond, ou tout autre signe clinique, jugé par le technicien expérimenté, comme indiquant un état de souffrance.

- Chaque étude est discutée avec l'ensemble de l'équipe de recherche afin de garantir la pertinence de chaque expérience. C'est pourquoi nous avons élaboré cette étude pilote qui permettra de définir le nombre minimum d'animaux à utiliser permettant l'obtention de résultats fiables et statistiquement exploitables grâce à des tests de type Mann et Whitney, que l'on peut utiliser sur de petits effectifs.

13136 La maladie d'Alzheimer est une pathologie neuro-dégénérative liée au vieillissement, touchant près de 900 000 personnes en France et représentant 80 % des cas de démences en France. Elle est caractérisée notamment par une diminution progressive de la mémoire. Elle peut être identifiée par deux principales modifications majeures : le dépôt de plaques amyloïdes à l'extérieur des cellules, d'une part et des agrégats intracellulaires de la protéine tau hyper-phosphorylée (Tau) d'autre part. Des études récentes ont montré que la caféine pourrait limiter la progression de la maladie en bloquant l'activité des récepteurs à adénosine de type A2A présents dans le cerveau. Cependant, les mécanismes d'action sont encore mal connus et pourraient impliquer différents types de cellules comme les neurones et/ou les astrocytes.

Le projet de recherche fondamentale que nous mènerons pendant 1 an vise à étudier le rôle des récepteurs A2A astrocytaires dans les effets induits par la caféine au niveau cérébral, nous testerons dans un premier temps les effets de la surexpression de ces récepteurs astrocytaires sur les niveaux de concentrations de certains neuromédiateurs. La surexpression de récepteurs n'étant pas réalisable chez l'homme, nous nous tournons vers un modèle murin de la maladie d'Alzheimer et nous intéresserons plus particulièrement à une zone cérébrale impliquée dans les déficits mnésiques observables dans ce modèle validé de la pathologie humaine : l'hippocampe dorsal.

Notre étude se basera sur les procédures de microdialyse décrites dans la littérature et réalisables chez l'animal anesthésié relevant de la classe sans réveil, car, pour répondre à notre question, la vigilance de l'animal n'est pas du tout nécessaire. Le nombre d'animaux correspondants aux différents groupes expérimentaux (40 au total) a été réduit au maximum sur la base des tests statistiques et des observations comportementales antérieures.

13137 Dans ce projet, nous voulons étudier l'organisation et le développement des circuits du système nerveux central des mammifères : comment deux populations de neurones s'interconnectent entre elles et dans quelle mesure leur connectivité est remaniée pendant le développement postnatal. Dans cette étude, nous étudierons différentes populations neuronales : la projection axonale binaurale du tronc cérébral impliquée dans la localisation des sons, celles des neurones moteurs de la moelle épinière et du cortex moteur primaire, ainsi que celle des neurones ganglionnaires rétiniens vers les centres visuels primaires.

Nous utiliserons comme modèle la souris. Vertébré de petite taille, elle possède une organisation des circuits sensorimoteurs très similaire à l'Homme. Nous marquerons les neurones qui composent ces circuits par deux approches complémentaires (transgéniques et virales) afin d'étudier la manière dont les axones et synapses sont agencés et remaniés au cours du développement postnatal. Les analyses histologiques des cerveaux seront réalisées post-mortem par microscopie optique sur coupes histologiques.

Au total 2172 animaux seront nécessaires à cette étude.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet du fait de la complexité des circuits neuronaux chez les vertébrés. Des études préliminaires sur nos systèmes de marquages ont été réalisées préalablement *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et scientifiquement fiables. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront

hébergées dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale. Pour les injections intracérébrales, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post-opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

13138 Dans leur première année de vie, les poulains sont infestés par des ascarides qui affectent leur croissance. L'accumulation de ces vers dans l'intestin peut conduire à des ruptures provoquant la mort des jeunes poulains. Les vermifuges utilisés pour contrôler ces infestations perdent de leur efficacité face à des populations parasitaires résistantes. Cette résistance peut être favorisée par l'utilisation de doses sub-optimales ou bien par une utilisation répétée du vermifuge. Chez le mouton, un transfert de vermifuge entre la mère et l'agneau via le lait maternel a été décrit, pouvant exposer les parasites à des doses sous-optimales chez le jeune et ainsi sélectionner des vers résistants. Nous proposons d'évaluer ce phénomène chez le poulain.

D'autre part, nous souhaitons mesurer l'impact de l'alternance entre culture et pâturage sur l'infestation des poulains. Cette alternance pourrait permettre d'éliminer la contamination environnementale par les ascarides, prévenant ainsi l'infestation des poulains et limitant l'usage des vermifuges.

Notre projet s'intéressera à 2 lots de 7 couples de juments et de leurs poulains (28 animaux) au cours d'une saison de pâture.

Réduction : L'étude porte sur deux lots de 7 couples d'animaux (n=28), effectifs suffisant pour établir des différences significatives au plan agronomique.

Raffinement : La mesure de vermifuge circulant se fera sur un nombre de points limités centrés autour du pic de concentration.

Remplacement : Aucun modèle *in vitro* ou *in silico* n'est disponible pour quantifier les effets d'intérêt ou modéliser ces situations d'élevage.

13139 Selon certaines théories, débattues actuellement sur la scène scientifique internationale, le langage humain trouverait son origine dans la communication gestuelle de nos cousins primates. Néanmoins, la grande majorité des études disponibles portent sur les grands singes. L'objectif de ce projet est de tester l'effet d'audience sur la communication gestuelle de singes non-hominoïdes, les mangabés à collier (*Cercocebus torquatus*). Les résultats de cette expérience permettront de mieux caractériser la communication gestuelle de cette espèce, en terme d'intentionnalité et de flexibilité et ainsi de rechercher de possibles anciens précurseurs de certaines compétences « langagières ».

Vingt individus captifs, d'âge et de sexe différents, seront testés individuellement. Le paradigme expérimental impliquera la production de gestes de quémante par le singe en direction d'un expérimentateur humain familier proposant une récompense, mais séparé de l'animal par un grillage.

Afin de tester l'effet de l'état attentionnel de l'audience sur la communication gestuelle, différentes conditions expérimentales sont prévues dans lesquelles l'état d'attention visuel de l'expérimentateur sera modifié (différentes orientations de tête et de corps). De plus, afin de tester l'effet de la compréhension de l'audience face au signal communicatif, l'expérimentateur donnera différentes réponses aux gestes de quémante.

Cette expérience nécessitera l'isolement partiel des individus étudiés durant toute la session expérimentale. Cet isolement, d'une durée variable de cinq à trente minutes selon le déroulement et l'enchaînement des conditions expérimentales, se fera dans l'un des compartiments du lieu de vie habituel des individus. Les singes testés seront toutefois en contact visuel et sonore avec leurs congénères, présents dans les compartiments adjacents. Un individu donné ne sera jamais testé plus d'une fois par jour.

La mise en place des expériences sera précédée d'une phase d'apprentissage des gestes de quémante. Les gestes de quémante ne sont pas produits naturellement par cette espèce, mais

peuvent toutefois être acquis et utilisés de manière communicative, comme l'ont montré de précédents travaux. L'apprentissage sera basé sur une ritualisation des actions de saisie de la nourriture dans la main de l'expérimentateur. Cela impliquera des sessions d'entraînement de dix à vingt minutes par individu, répétées sur plusieurs semaines. Cette phase d'apprentissage préalable pourra nécessiter un isolement partiel des individus, afin d'empêcher les situations de compétition entre les singes face à la récompense de l'expérimentateur.

REMPLACEMENT : L'objectif du projet étant de caractériser des comportements communicatifs et sociaux, il est obligatoire de travailler sur des animaux vivants.

REDUCTION : L'effectif total envisagé est un minimum pour représenter la composition d'un groupe social en terme de sexe et d'âge des individus, afin d'obtenir des résultats généralisables à l'ensemble de cette population captive.

RAFFINEMENT : La procédure expérimentale prévue est non invasive. Les tests auront lieu dans le lieu de vie habituel des singes étudiés, dans leur compartiment ou dans les compartiments avoisinants. L'isolement partiel des individus, nécessaire à la mise en place de l'expérience, sera de durée limitée et n'impliquera pas de manipulation directe. Les animaux étudiés sont déjà familiers avec cette procédure d'isolement non forcée.

13140 La capacité des organismes vivants à percevoir les contraintes environnementales est cruciale pour interagir avec le monde qui nous entoure.

Il a déjà été montré chez des sujets âgés et des patients diabétiques l'influence de la sévérité de la neuropathie sur l'augmentation du nombre d'escarres et l'augmentation de la sévérité des escarres. Les escarres et plaies du diabétique apparaissent au niveau de zones de pression avec comme facteur de risque extrinsèque commun l'excès de pression, qui induit une diminution localisée du débit sanguin (ischémie) et donc de l'apport en oxygène (hypoxie) et nutriments. Les neuropathies périphériques sensorielles peuvent inhiber la sensation de toucher et la perception de la douleur, retardant la prise en charge et le traitement des ulcères, ce qui diminue d'autant plus la rémission.

De plus, à la suite d'une blessure cutanée (coupure ou brûlure), le processus de cicatrisation commence par une phase vasculaire et inflammatoire. Certaines blessures guérissent facilement alors que d'autres vont prendre plus de temps, surtout si la personne présente une neuropathie périphérique. Toutefois la contribution de l'innervation épidermique dans les capacités vasculaires cutanées et la cicatrisation n'est pas connue.

Le but de cette étude est donc d'identifier le rôle de l'innervation épidermique dans les capacités d'ajustement de la microcirculation cutanée face aux pressions et à la chaleur ; ainsi que les capacités de cicatrisation de la peau. Pour cela nous étudierons des souris qui présentent une déficience de l'innervation cutanée.

Nos travaux devraient enrichir les connaissances sur le rôle de l'innervation épidermique dans les mécanismes de défense et de cicatrisation de la peau.

Notre projet inclut la règle des 3R. En effet, la réactivité vasculaire cutanée repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier, elles seront observées 3 fois par semaine et pesées une fois par semaine. Les points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet concernera 150 souris au maximum.

13141 Les étherlipides correspondent à une classe de lipides minoritaires mais impliqués dans tous les processus physiologiques de l'organisme. Leur implication s'étend de la petite enfance au stade de vieillissement, et est souvent établie dans les cas pathologiques en raison de leur carence. Ils sont

notamment connus pour leurs effets bénéfiques sur le système immunitaire, la production de cellules sanguines, la reproduction ou encore contre la croissance tumorale.

Le projet présenté ici vise à compléter des rates en lactation avec une administration orale d'huile purifiée d'étherlipides. L'objectif consiste à mesurer l'impact de cette supplémentation au niveau du métabolisme étherlipidique impliqué dans les fonctions intestinales et cérébrales, à la fois chez la mère et ses petits. L'effet des étherlipides sur la composition biochimique du lait maternel sera recherché ainsi que les conséquences sur le microbiote laitier et intestinal. Cette étude permettra également la mise au point d'outils de mesure de marqueurs étherlipidiques potentiellement impliqués dans le développement cognitif et émotionnel des nouveau-nés. Ainsi 12 rates gestantes puis allaitantes feront l'objet de ce projet, avec 8 de leurs petits. Elles seront soumises à un gavage quotidien (6 contrôles et 6 supplémentées en étherlipides) sur une période de 3 semaines, soit du lendemain de la mise basse jusqu'au sevrage des petits. Un prélèvement de lait maternel sera réalisé sur les rates 7, 14 et 21 jours après la naissance des petits. Le contenu gastrique sera analysé sur deux petits par portée, à 7 jours puis à 14 jours, tandis que les marqueurs d'intérêt seront recherchés au sevrage des petits, soit à 21 jours. Les procédures décrites sont réalisées sur 12 rates durant la lactation, mais le projet global tient également compte de 8 petits par femelles (96 ratons), soit 108 animaux en tout.

Remplacer. L'effet recherché étant nutritionnel et se situant durant la phase développementale des nouveau-nés, l'étude porte sur des femelles avec leurs petits respectifs, sans possibilité de remplacer par une étude sans animaux. Réduire. Le projet est mené sur un nombre restreint mais suffisant de mères allaitantes pour obtenir des effets sur les ratons ainsi que les rates : l'huile purifiée d'étherlipides est en effet administrée oralement dans des conditions expérimentales favorisant son absorption maximale et à une dose garantissant l'impact métabolique recherché. Raffiner. Les mères gestantes puis allaitantes seront logées séparément pour un meilleur confort mais avec un contact visuel, auditif et olfactif avec leurs congénères et une surveillance quotidienne. Les prélèvements de lait seront espacés d'une semaine et limités à 1 mL de sorte que la procédure n'impacte pas la croissance des petits. Enfin l'administration d'étherlipides au quotidien est choisie afin d'apporter une moindre quantité journalière d'huile, et ainsi mieux maîtriser l'apparition potentielle d'effets imprévus, même si cette huile n'a pas été décrite autrement que pour son action bénéfique sur la santé.

13142 Le risque de mort subite chez les patients épileptiques (SUDEP) est trois fois plus élevé que chez les personnes saines. Il existe un modèle idéal de SUDEP chez la souris correspondant à une crise épileptique induite par un stimulus sonore et possiblement suivie du décès (crise audiogène ou AGS pour « audiogenic seizures » en anglais).

Un travail récent a montré que la fenfluramine, un activateur de certains neuromédiateurs du cerveau, diminue les crises mais aussi diminue les arrêts respiratoires causant des décès en cas de crise, chez la souris DBA/1 dans le modèle de l'AGS. Seulement la fragilité inhérente de la lignée DBA/1 ne la rend pas candidate pour d'hypothétiques explorations physiologiques nécessitant la pose d'électrodes durant une micro-chirurgie.

Nous avons montré qu'il y a bénéfice à utiliser la lignée de souris 129/SvTer dans le modèle de SUDEP - AGS. Elle est bien plus robuste et chirurgie-compatible, sensible à l'AGS, avec une sensibilité croissante avec l'âge. Seulement, l'effet protecteur de la fenfluramine sur cette lignée 129/SvTer n'a jamais été exploré. Dans le but à moyen terme d'enregistrer (électroencéphalographie) la réponse à l'AGS de souris 129/SvTer sous fenfluramine dans le cadre de travaux visant à minimiser les SUDEP, nous devons initialement établir des courbes-doses chez cette lignée pour 1/ évaluer la dose optimale qui protège contre les arrêts respiratoires et pour 2/ évaluer l'intervalle de temps optimal entre l'injection de fenfluramine et le test à l'AGS.

Les paramètres dose/délai optimaux observés avec la lignée DBA/1 sont 15 mg/kg et 16h. Nous proposons donc pour l'établissement des courbes dose-réponse de faire varier la dose de fenfluramine selon 4 modalités (0, 10, 15, 20 mg/kg) et de faire varier le délai entre l'injection et le test selon 3 modalités (12h, 16h, 20h). Il y aura donc, en tout, 12 groupes de souris qui seront constitués de 40 souris chacun. Effectivement, comme non seulement toutes les souris 129/SvTer

ne répondent pas à l'AGS (~50 %) et qu'en plus, la fenfluramine inhibe les crises, si on veut obtenir au moins 10 souris par groupe qui présentent une crise tonique potentiellement associée à des arrêts respiratoires, il est nécessaire d'objectiver 40 souris par groupe. Donc en tout, nous testerons 480 (40x12) souris.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in-vitro en remplacement de l'approche in-vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant. La justification des tailles des échantillons a été précisée dans le paragraphe précédent. Nous estimons que des courbes 3 points pour le délai, correspondant à la valeur optimale observée chez la lignée DBA/1 16h±25 %, est le protocole minimal nécessaire. Tout comme nous estimons que des courbes 3 points (sans tenir compte du groupe contrôle) pour la dose correspondant à la valeur optimale observée chez la lignée DBA/1 15 mg/kg ±50 %, est aussi le protocole minimal nécessaire. Enfin, notre protocole suit des procédures standardisées soigneuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages autant que faire se peut, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie.

13143 Le cœur est une pompe dont la contraction (grâce à la libération de calcium) est couplée à la production d'énergie (ATP). Une altération de ce couplage est à l'origine d'une incapacité du cœur à assurer sa fonction de pompe, et mène, à terme, à un arrêt cardiaque. Le but de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes induisant ce découplage afin de trouver des traitements pharmacologiques ou des cibles thérapeutiques pertinentes dans le contexte de la cardiomyopathie du patient atteint d'une maladie génétique: la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Pour se faire, nous utiliserons un modèle murin de la Dystrophie Musculaire de Duchenne dans lequel il a été retrouvé une dysfonction dans la libération de calcium et dans la génération d'ATP. Pour cette pathologie il n'existe aucun traitement pharmacologique. Afin de trouver le traitement le plus adapté pour empêcher l'évolution de la pathologie, nous étudierons les phases précoces des atteintes cardiaques et testerons 3 molécules pharmacologiques ciblant soit la perturbation du calcium soit celle de la production énergétique soit les deux.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris après la naissance (nombre estimé à 70) pour déterminer l'élément initiateur de la pathologie jusqu'à l'âge adulte (nombre estimé: 358 sur 5 ans) pour tester les différents traitements pharmacologiques. Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences aux mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (utilisation du même contrôle pour les différents traitements testés, utilisation des mêmes souris pour plusieurs expériences, choix de la télémétrie pour acquisition de l'électrocardiogramme sur animaux vigiles). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux en appréciant au mieux les points limites (mise en place d'une grille d'évaluation des signes de douleurs), en utilisant une anesthésie gazeuse et analgésie avant toute chirurgie et en post-opératoire afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse). Enfin, un suivi journalier de l'animal depuis l'arrivée de l'animal à l'animalerie jusqu'à son utilisation sera effectué. Lors de ce suivi différents points seront contrôlés tels que la prise de poids, l'apparence du pelage (ne doit pas être collant, non entretenu ou hérissé, piqué) et des zones suturées. Une attention particulière sera portée sur toutes modifications du comportement comme les modifications d'activité locomotrice (signes d'hyper- ou hypo- activité, tremblements, et déplacements rotatoires ou agressivité). Pour assurer le bien-être des animaux, ces derniers sont stabulés par cage de 5 sur des portoirs ventilés dans une pièce de l'animalerie agréée A1, sous contrôle permanent des températures, hygrométrie et sous un cycle de lumière (12/12h). En terme d'enrichissement, des plaques de cotons de cellulose (safe square) leur permettant de faire un nid sont ajoutés et les animaux ont des cabanes en plexiglass teinté. Les animaux ont accès à la nourriture et eau ad libitum.

13144 Le virus de la rougeole (VR) qui compte parmi les plus contagieux chez l'homme, est l'une des principales causes de mortalité chez le jeune enfant du fait de sa capacité à immuno-supprimer son hôte. Depuis 2008, la forte baisse des vaccinations a entraîné une forte résurgence de la maladie en France, en Europe et aux Etats-Unis. Au cours de ces dernières années, la capacité de certains peptides à bloquer l'infection par le VR a été mise en évidence *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Depuis, une nouvelle génération de peptides jusqu'à dix fois plus efficaces *in vitro* et qui ont montré leur efficacité préventive *in vivo* chez la souris a été développée. L'efficacité de ces peptides contre différentes souches du virus de la rougeole circulant actuellement dans le monde, ou des génotypes possédant des mutations identifiées chez les patients atteints d'encéphalite rougeoleuse létale est en cours d'analyse *in vitro* et *ex vivo*. Il est à présent nécessaire d'étendre ces recherches à plusieurs souches du VR *in vivo*, afin de déterminer la posologie idéale en prévention et étudier par la suite l'efficacité des peptides par traitement post-exposition. Cette expérience s'inscrit dans un projet plus large qui consiste à étudier le potentiel antiviral *in vivo* de différents composés qui ont démontré une grande efficacité *in vitro* et *ex vivo* pendant les études en cours. Si l'efficacité antivirale est démontrée *in vivo* chez la souris, cette étude permettrait par la suite d'envisager un passage chez le primate pour le développement d'un possible nouveau traitement anti-rougeoleux, un jour applicable à l'homme. Contrairement au primate, la souris est un petit animal de laboratoire, facile à manipuler et très bien caractérisé du point de vue immunologique. Deux lignées transgéniques de souris, exprimant le récepteur humain d'entrée du VR, sont susceptibles à l'infection intra-nasale par le VR, qui présente la voie naturelle d'infection. Elles développent des atteintes neurologiques létales similaires à celles observées chez l'homme, et apparaissent donc comme un bon modèle pour l'étude de molécules à visée thérapeutique. Seuls les peptides ayant un fort potentiel selon nos études *in vitro* et *ex vivo* seront évalués chez la souris. De façon à réduire l'utilisation des animaux, le protocole se déroulera en trois étapes. Dans un premier temps, l'administration par voie intra-nasale des peptides permettra d'évaluer la bio-distribution des peptides ainsi que leur innocuité. Les peptides ayant démontré l'absence de toxicité seront considérés pour la suite des analyses. Dans un second temps, la dose létale 50% des différentes souches du VR sera déterminée afin de réaliser les expériences suivantes. La calibration au préalable de l'inoculum viral permettra de bien fixer les conditions pour l'évaluation des antiviraux et minimiser ainsi le nombre de souris utilisées. Enfin, l'efficacité antivirale des peptides sera ensuite évaluée face au challenge infectieux *in vivo*. Les expériences seront organisées en groupes de six individus (équilibre male/femelle) par condition expérimentale, nombre suffisant pour une interprétation statistique des résultats. Une répétition de l'expérience sera effectuée seulement lorsqu'une efficacité des peptides est observée (efficacité supérieure à 50% d'inhibition de l'infection), portant les groupes à un total de douze individus. Sur une période de 5 ans, nous prévoyons l'utilisation de 696 souris. Les protocoles que nous utilisons sont bien établis pour réduire au maximum le stress et la douleur chez l'animal. Ainsi, toute manipulation susceptible d'entraîner du stress ou de la douleur se fera sous anesthésie. Une surveillance adaptée des animaux par du personnel compétent permet de limiter toute souffrance animale. Ainsi, l'état clinique des animaux sera suivi pendant toute la durée de l'expérimentation. Une attention toute particulière sera portée aux animaux pendant la période critique de l'infection à savoir de 7 à 14 jours post-infection afin d'évaluer leur bien-être et d'intervenir rapidement en cas de nécessité pour limiter toute souffrance. Les signes cliniques que l'infection par ces virus provoque chez les animaux sont bien connus et des points limites bien précis et suffisamment précoces et prédictifs ont été définis au cours des 10 dernières années d'expérimentation pour prévenir tout stress et toute souffrance. Toute atteinte de ces points limites entraînera la mise à mort immédiate de l'animal. Chaque expérience avec un nouveau candidat antiviral fera l'objet d'une étude rétrospective avant de lancer un nouvel essai, afin de tirer les leçons de l'étude précédente pour améliorer si possible le programme de soins.

13145 1. Objectifs scientifiques du projet :

Malgré le développement récent de thérapies ciblées et immunitaires, le mélanome cutané reste l'un des cancers les plus mortels, de par sa forte propension à métastaser. Mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent le développement du mélanome est donc crucial. Bien que de nombreux acteurs moléculaires aient été caractérisés pour leurs rôles importants dans l'initiation et

la progression du mélanome cutané, peu de choses sont connues concernant les paramètres biomécaniques qui s'exercent au sein de l'épiderme lors de la formation et de la croissance d'un mélanome, qui participent pourtant à la dissémination métastatique. Les processus de tumorigénèse seront abordés à travers l'étude de l'organisation des cellules tumorales (aspect morphologique) et le lien entre la tumeur et son micro-environnement (aspect bio-mécanique), *in vivo* dans un modèle de poisson Medaka qui développe spontanément des mélanomes.

2. Retombées attendues : Les données obtenues permettront de mieux comprendre les forces biomécaniques qui s'exercent entre le mélanome et les cellules de l'épiderme qui l'entourent et quels rôles elles pourraient jouer dans la progression du mélanome cutané, pour comprendre les aspects biomécaniques de la dissémination tumorale.

3. Conformité par rapport aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Remplacement : un certain nombre d'expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires, y compris des lignées générées à partir de prélèvements de patients a été réalisé préalablement, mais il n'existe pas à l'heure actuelle de système *in vitro* capable de mimer tous les processus complexes qui ont lieu au cours du développement du mélanome dans son environnement *in vivo*. L'étude du mélanome cutané nécessite donc l'utilisation d'un modèle animal.

Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit au minimum puisque l'élevage des lignées transgéniques sera réalisé à l'état hétérozygote où le phénotype est moins dommageable et que seuls les poissons homozygotes générés au cours de cet élevage seront utilisés à des fins expérimentales.

Raffinement : Des points limites sont fixés afin de réduire la souffrance des animaux qui est évaluée à un niveau modéré. Les poissons seront surveillés de manière bi-hebdomadaire afin d'anticiper toutes dégradations de l'état général de l'animal au cours de la tumorigénèse et de manière à éviter toute souffrance animale. Tout poisson présentant des signes généraux évocateurs de mal-être (amaigrissement, problème de nage, nécrose des nageoires due au développement d'un mélanome) sera mis à mort et les poissons restants seront regroupés au fur et à mesure pour les conserver en bancs. Par ailleurs, le génotypage pourra être évité puisqu'une corrélation génotype/phénotype a clairement été établie.

4. Nombre d'animaux inclus dans ce projet

Au total, pour le maintien des 2 lignées de Medaka transgéniques nécessaires à l'étude, et les expériences du projet, 1800 poissons seront utilisés sur 5 ans. Dans le cadre des expériences, les animaux seront mis à mort à différents temps après l'apparition du mélanome et une étude sera réalisée soit sur poisson entier pour mesurer les forces biomécaniques dans la tumeur et le tissu adjacent, soit après dissection et extraction pour étudier des marqueurs moléculaires, soit sur poissons fixés puis coupés pour réaliser des marquages histologiques.

13146 Tout d'abord envisagés comme traitement thérapeutique dans les retards de croissance et le diabète, les substances analogues d'IGF-I peuvent être détournées pour augmenter la prise de masse musculaire. Les études scientifiques sur ces analogues notamment Des (1-3) - IGF-I, et LR3-IGF-I se sont limitées aux effets chez l'animal. Ils ne sont pas autorisés pour usage thérapeutique chez l'homme mais sont néanmoins disponibles sur le marché noir et via internet depuis plusieurs années et seraient utilisés par certains sportifs notamment dans le bodybuilding. Pour limiter leur usage, il est nécessaire de pouvoir identifier ces composés dans le cadre de contrôles anti-dopage. La présente étude consiste à reproduire chez l'animal un protocole proche de celui qui serait utilisé par les sportifs qui abusent de ces produits: injections en intramusculaire répétées et entraînement sportif.

Les objectifs du projet sont: 1- de vérifier si la prise répétée de ces analogues permet d'augmenter la masse musculaire et la performance

2- d'évaluer la capacité de détection de ces analogues dans le plasma en employant une méthode d'analyse par spectrométrie de masse, et la fenêtre de détection.

Cette étude nécessite l'utilisation de rongeurs car la dégradation et l'élimination des produits injectés ne peut se modéliser *in vitro* et nécessite des organismes dans leur intégralité, de plus ces produits restent non autorisés chez l'homme.

3 groupes de 10 rats Wistar mâles d'environ 8 semaines (jeunes adultes) sont nécessaires pour évaluer l'effet sur la performance: un groupe placebo (recevant du sérum physiologique), un groupe recevant l'analogue Des (1. 3)- IGF-I et le dernier groupe recevant l'analogue LR3-IGF-I.

L'administration des analogues sera effectuée sous anesthésie 1 fois par jour pendant 5 jours sur 3 semaines, en alternant l'administration sur pattes avant et pattes arrière d'un jour à l'autre, et sera suivie de séances d'entraînement à la course. Un prélèvement sanguin sera réalisé chaque semaine sous anesthésie. Les échantillons prélevés seront analysés pour évaluer l'effet d'une administration répétée quotidienne sur la cinétique d'élimination. Pour évaluer l'effet sur la performance physique, 2 tests seront réalisés par semaine: un test d'agrippement (test Grip strength) pour quantifier objectivement la force musculaire des rats, et un test de course sur tapis roulant pour étudier l'effet sur l'endurance, la fatigue et la récupération à l'effort. L'évolution des performances de chaque rat dans chaque groupe avant/pendant et à la fin des administrations sera étudié. Les animaux seront surveillés quotidiennement et retirés du protocole en cas de perte de poids, blessure ou prostration. Ils seront euthanasiés à la fin du protocole.

Ce projet permettra de mieux surveiller les sportifs pour limiter l'usage des analogues d'IGF-I, dont les conséquences sur la santé chez l'homme restent inexplorées.

13147 La réponse inflammatoire a lieu après une infection et permet de lutter contre les pathogènes. Cependant, elle doit être limitée pour éviter que les tissus sains soient endommagés. La résolution de l'inflammation est donc essentielle pour le maintien de l'équilibre des tissus. Une des cellules les plus importantes dans la résolution de l'inflammation est le macrophage, qui passe d'un état pro-inflammatoire à un état anti-inflammatoire, permettant le basculement de la réponse inflammatoire. Les glucocorticoïdes sont un des médicaments les plus utilisés au monde pour leur propriétés anti-inflammatoires. Cependant, des traitements prolongés induisent des effets secondaires non désirables. Les glucocorticoïdes activent ce changement de phénotype dans les macrophages, ce qui permet d'accélérer la résolution de l'inflammation et de protéger les tissus. Des travaux récents ont montré que différentes voies de signalisation sont impliquées dans ce changement de phénotype des macrophages, et notamment des voies métaboliques de la cellule. Des évidences expérimentales *in vitro* montrent que ces voies métaboliques et celle des glucocorticoïdes sont connectées, ce qui pourrait à terme permettre une meilleure utilisation de ces derniers, afin d'éviter leurs effets indésirables.

Après ces évidences *in vitro*, le projet vise à valider *in vivo* au niveau de l'organisme les interactions entre les voies métaboliques et les glucocorticoïdes dans un modèle d'inflammation aiguë du poumon qui mime une infection. L'analyse *in vivo* est la seule à pouvoir rendre compte de la fonctionnalité de l'organe. Ce projet comprend une seule procédure qui vise à étudier l'effet des glucocorticoïdes sur la fonctionnalité des poumons, donc sur la survie des animaux déficients pour les voies métaboliques dans les cellules macrophagiques dans le modèle d'inflammation aiguë du poumon. Ce projet sera réalisé chez la souris, le modèle ayant été validé par plusieurs études comme étant proche de la physiopathologie humaine. En effet, la mortalité des patients atteints de choc septique est de 30 à 60% et le traitement par les glucocorticoïdes est encore en débat du fait de la balance des effets bénéfiques/délétères. Nous estimons que ce projet mobilisera au maximum 96 souris.

Une attention particulière sera accordée à la règle des 3R :

- Réduire et remplacer : le projet arrivant en fin d'étude et le modèle étant connu, le strict nombre de souris nécessaires sera utilisé. Les analyses statistiques précédentes de l'équipe permettent d'ajuster le nombre d'animaux requis au minimum.

- Raffiner : les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement enrichies en coton et avec du gel alimentaire à proximité. Lors de la procédure, un contrôle très régulier des animaux sera réalisé en suivant un tableau définissant les points limites.

13148 Dans le monde, le nombre de patients atteints d'une maladie neurodégénérative (comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson), ou psychiatrique (comme la schizophrénie et la dépression), est estimé proche du milliard. L'allongement de la durée de vie est un facteur majeur d'augmentation de ce nombre. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent. Ces maladies se traduisent par des altérations neurologiques complexes associées à des symptômes comportementaux pouvant être reproduits en partie chez le rat à la suite d'une altération de son génome, d'une modification de son environnement, ou encore en lui administrant des agents chimiques ou des préparations biologiques destinées à modifier le fonctionnement du système nerveux. Ces rats sont des modèles pré-cliniques à forte valeur translationnelle à l'homme, qui permettent l'identification de nouveaux bio-marqueurs et de nouvelles cibles qui contribuent au développement de meilleurs traitements pour ces pathologies.

Actuellement, notre recherche porte essentiellement sur les maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson) et utilise uniquement des modèles souris. Cependant, compte-tenu de l'émergence des modèles de rats génétiquement modifiés, des avantages en termes de taille du cerveau plus grande, ou de concordance d'espèce avec les études de pharmacologie de sécurité, nous souhaitons progressivement mettre en place certains modèles chez le rat plutôt que chez la souris.

Ce projet a les objectifs successifs suivants :

- 1) Induire des modèles de pathologies neuropsychiatriques chez le rat.
- 2) Pour chaque modèle, caractériser le degré d'atteinte fonctionnelle sur le plan comportemental, immuno-histologique ou biochimique.
- 3) Démontrer qu'il est possible de réduire ces signes de pathologie neuropsychiatrique ou de ralentir leur apparition en administrant aux animaux des molécules de référence non commercialisées mais dont le profil pharmacologique est connu (phase de validation pharmacologique du modèle).
- 4) Sélectionner nos meilleurs traitements pharmacologiques (préalablement testés par des approches *in vitro*) en termes d'efficacité et de sécurité, et pouvant être évalués ensuite chez l'homme.

Les phases 2) et 3) permettront d'appréhender le nombre et la constitution des groupes d'animaux qui seront nécessaires pour la phase 4). Autrement dit, aucun animal ne sera utilisé pour des études d'efficacité si le modèle n'est pas validé préalablement sur le plan comportemental et/ou biochimique et/ou immuno-histologique. Certaines études biochimiques ou immunohistologiques pourront être conduites sans test comportemental préalable. Cependant, dans un souci de réduire le nombre d'animaux utilisés, les études comportementales seront presque toujours suivies de mesures biochimiques et/ou immunohistologiques.

Au total, compte-tenu de la variété des techniques d'induction de modèle pour mimer les pathologies humaines, du nombre de mesures comportementales, histologiques ou biochimiques envisagées, du nombre de cibles thérapeutiques qui seront étudiées, et de la nature de ces cibles (impliquées dans des maladies neurodégénératives ou psychiatriques), l'estimation du nombre de rats nécessaires sur les cinq années prévues pour ce projet est de 2700.

Le but ultime du projet est de trouver des traitements pharmacologiques efficaces sur les pathologies du système nerveux. Cette efficacité ne peut être vérifiée que sur l'animal. Le rat – comme la souris - est une espèce adaptée car son génome, sa physiologie et son répertoire comportemental se rapprochent de ceux de l'homme. De plus, c'est une espèce pour laquelle la communauté scientifique dispose de nombreuses données tant sur les inductions de pathologies que sur le registre comportemental.

Tous les rats de ce projet feront l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Ce suivi permettra d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire les animaux des études en cas d'atteinte des points limites définis. Il sera accru pour les lignées de rats génétiquement altérés susceptibles de présenter un phénotype dommageable. Les animaux

disposeront de bandelettes de papier frisé pour se construire un nid ou de morceau de bois à ronger dans leur cage d'hébergement.

Les phases de chirurgie nécessaires à certaines inductions de modèles ou traitements pharmacologiques seront réalisées sous couverture anesthésique et analgésique. Ils seront remis en groupe dès que possible en post opératoire afin d'éviter le stress de l'isolement, et leur surveillance sera renforcée. Certains tests comportementaux étant susceptibles d'engendrer un stress mineur pour l'animal, souvent lié à la nouveauté de la situation ou à l'isolement, nous envisageons alors qu'ils soient de courte durée pour stopper rapidement la source de stress.

Pour chaque étude, lorsque suffisamment de données pharmacologiques seront réunies, une consultation statistique sera programmée pour réajuster le nombre d'animaux nécessaire, soit parce que l'étude est nouvelle, soit parce que le nombre d'animaux pour cette étude a été évalué depuis longtemps.

13149 La réparation des défauts osseux résultant de diverses pathologies (cancers, traumatismes, kystes, fractures ostéoporotiques et/ou infections), représente un défi majeur de santé publique. En effet, lorsque les défauts sont volumineux, la reconstitution est partielle, la consolidation est retardée et le risque de séquelles invalidantes est élevé. Le traitement de ces défauts repose essentiellement sur l'apport d'os autologue (provenant du soi et administré à soi), cependant ces greffes nécessitent la formation d'un second site opératoire et une quantité parfois importante d'os. Ces limitations rendent nécessaire l'utilisation de substituts osseux (greffe d'origine humaine, d'origine animale ou un matériau synthétique). Actuellement différentes familles de substituts osseux sont disponibles sur le marché. Des matériaux bioactifs, tels que du verre bioactif à base de silicate font partie des substituts osseux utilisés. Ce matériau est biocompatible, sous forme de granules et possède des propriétés d'ostéo-intégration. Il favorise la réparation des défauts mais ses performances à court terme ne sont pas encore optimales pour la chirurgie de la colonne vertébrale, la consolidation de la fracture et l'augmentation de la crête alvéolaire en implantologie dentaire. De nouvelles compositions de verres à base de pyrophosphate ont été synthétisées, dans le cadre du développement de matériaux innovants permettant une réparation osseuse plus rapide. On pense que ces verres de nouvelle génération présentent une cinétique de résorption et une capacité de formation osseuse qui permettent de surmonter les limites de performance des verres bioactives actuels.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel réparateur de ces nouvelles formulations de verres à base de pyrophosphate. Leur efficacité à combler et réparer des défauts osseux et leur cinétique de résorption seront évaluées dans des défauts osseux chez le rat. Les formulations à tester seront choisies suite à l'évaluation *in vitro* de leur cytotoxicité et leur potentiel à stimuler la différenciation et la minéralisation des cellules souches mésenchymateuses humaines. Un verre bioactif à base de silicate, sera utilisé comme contrôle positif et des défauts non comblés seront utilisés en tant que contrôles négatifs. Des défauts osseux fémoraux (1er et 2ème partie de l'étude) et crâniens (3ème partie de l'étude) seront créés et comblés avec ces différents types de substituts osseux et suivis pendant deux mois. Après l'euthanasie des animaux, les échantillons seront prélevés, scannés et les caractéristiques structurales, mécaniques et biologiques du tissu osseux cicatriciel seront analysées. Pour cette étude 138 rats Wistar seront nécessaires.

Compte tenu de la complexité du processus de cicatrisation osseuse, faisant intervenir plusieurs systèmes (vasculaire, nerveux, etc..), il est difficile d'étudier la réponse tissulaire et le potentiel ostéoformateur d'un substitut osseux par un modèle "*in vitro*" ou "*in silico*", d'où la nécessité de réaliser cette étude chez l'animal. Afin de réduire le nombre d'animaux, il sera réalisé (i) un minimum d'échantillons (8 par groupe) permettant, compte tenu des écarts constatés pour les différents paramètres de la réparation osseuse étudiés, d'avoir un test statistique significatif, (ii) un suivi de la cicatrisation sur le même animal à l'aide d'un micro scanner *in vivo* (iii) plusieurs méthodes de caractérisation (biologiques, mécaniques et imagerie multimodale), (iv) une planification des expérimentations par série permettant de redéfinir différents paramètres du protocole. Afin d'obtenir le plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal, le modèle animal et le protocole expérimental ont été choisis en prenant en compte l'état actuel des connaissances

et notre expertise issue des expérimentations précédentes. A chacune des étapes pré, per et postopératoires, l'absence de souffrance ou d'inconfort (diminution de l'appétit, de l'activité, boiterie...) sera contrôlée, jusqu'à la fin de l'étude, par une observation régulière de l'animal et quantifiée grâce à un tableau de score établi. Selon le score, des soins et une médication analgésique appropriée seront mis en place. En cas de manifestations douloureuses et/ou d'inconfort réfractaires aux soins adaptés, l'animal sera mis à mort. Les étapes du protocole ont été planifiées afin de prévenir toutes perturbations susceptibles de limiter la validité de l'expérience.

Les résultats de cette étude préclinique permettront : (i) d'évaluer l'efficacité (ostéoformation et résorption) des nouvelles formulations des bioverres à base de pyrophosphate, (ii) de définir la formulation optimale avant l'utilisation chez l'homme et (iii) de mettre en place un protocole de recherche clinique.

13150 Les infections ostéo-articulaires sont des infections qui touchent les os et/ou les articulations. Ce sont des pathologies graves susceptibles d'entraîner un handicap très lourd et parfois de mettre en jeu le pronostic vital. Elles peuvent survenir chez les patients porteurs de prothèse articulaire ou de matériel (clou, plaque, vis...) mais aussi à la suite de traumatismes (fractures ouvertes sans matériel), engendrant des ostéites chroniques. Actuellement, les infections ostéo-articulaires sont le plus souvent dues à des staphylocoques, notamment *Staphylococcus aureus* et sont traitées par antibiothérapie. Cependant, l'antibiothérapie classique a montré ses limites pour diverses raisons : résistance des souches bactériennes, mauvaise diffusion des antibiotiques dans le tissu osseux, présence de matériel étranger (ex : prothèse) favorisant la formation de biofilm bactérien (lequel protège la bactérie de l'action des antibiotiques). Dans ce contexte, il est donc aujourd'hui nécessaire de trouver des solutions alternatives et/ou complémentaires aux antibiotiques, efficaces pour traiter ces infections.

La phagothérapie (usage de bactériophages) apparaît aujourd'hui comme une solution pertinente. Les bactériophages sont des virus qui possèdent la particularité de n'infecter que les bactéries, d'être inoffensifs pour tous les organismes eucaryotes tels que les mammifères (humains, animaux) et d'être très spécifiques de l'espèce bactérienne qu'ils attaquent. Ils sont déjà largement utilisés chez l'homme sous forme de cocktails en Europe de l'Est mais, s'agissant d'organismes vivants, leur développement en France se heurte à un cadre réglementaire peu clair et inadapté à la phagothérapie dans la conduite d'essais cliniques. De ce fait, les agences réglementaires demandent la réalisation d'études pré-cliniques préalables. Le projet présenté ici s'inscrit dans la conduite d'un projet collaboratif.

Dans ce projet, il est donc prévu :

1. De mettre au point un modèle d'infection ostéoarticulaire à *Staphylococcus aureus* chez la souris avec matériel étranger ;
2. De tester l'efficacité d'un cocktail de bactériophages dans ce modèle

Pour la mise en œuvre de ce projet, 336 souris Balb/c femelles seront utilisées.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Tout d'abord plusieurs études pilotes sont prévues afin de réduire au maximum le nombre d'animaux par point dans les phases d'efficacité. De plus, même pour les phases pilote, le nombre d'animaux sera diminué (8 au lieu de 10 par inoculum testé). Suite à cette phase pilote, une nouvelle réduction des effectifs sera prévue pour la phase d'efficacité (6 souris au lieu de 8). Un gros travail a été réalisé *in vitro* sur l'efficacité du cocktail de bactériophages sur un grand nombre de souches de *S. aureus* ainsi que dans des modèles de biofilm. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, la totalité des procédures chirurgicales impliquant les animaux sera réalisée sous anesthésie générale afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum et une analgésie post-opératoire sera mise en place, permettant ainsi le raffinement de l'étude. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance quotidienne sera également réalisée pour cette étude.

13151 Chez l'homme, lors d'une infection pulmonaire grave, le parenchyme pulmonaire va rapidement présenter des signes de dysfonctionnement qui vont se généraliser, même si l'infection est localisée. Cette altération du parenchyme pulmonaire est due à une inflammation généralisée du poumon qui va être responsable de séquelles pulmonaires : la fibrose. Cette fibrose pulmonaire est liée à la persistance de l'inflammation au sein des alvéoles qui est entretenue par une dysfonction des deux cellules clés : les neutrophiles et les macrophages qui vont présenter au cours de l'infection pulmonaire des anomalies de leur métabolisme intracellulaire. Il n'existe malheureusement pour le moment pas de traitement permettant une restauration des fonctions immunitaires lors d'une agression pulmonaire aiguë, à l'origine d'une augmentation de la mortalité. Afin d'étudier ces perturbations du système immunitaire, nous aimerions développer un modèle d'agression pulmonaire aiguë bactérienne chez la souris. Une infection pulmonaire traitée par antibiotiques nous permettra d'étudier les cellules immunitaires pulmonaires et sanguines, de mettre en évidence leur dysfonctionnement et d'évaluer l'efficacité de thérapeutiques sur l'immunité mais aussi sur les séquelles parenchymateuses pulmonaires (fibrose), étape indispensable avant d'éventuelles études chez les patients.

Le respect de la règle des 3R dans ce projet se traduit par :

Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera de 840 souris.

1. Remplacement : le développement d'un modèle de dysfonctionnement du système immunitaire pulmonaire nécessite d'une part une infection comme facteur déclenchant et, d'autre part, l'accès aux organes d'intérêt pour évaluer les conséquences de cette immunodépression. Ceci n'est absolument pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour le développement de ce type de modèle.

2. Réduction : les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

3. Raffinement : les animaux sont élevés dans des conditions adaptées : locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum, maximum 5 animaux/cage et aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage. L'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques permettra d'éviter toute souffrance aux animaux. De plus, l'évaluation régulière du score de grimace des animaux et le suivi de leur poids et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé.

13152 Le paludisme est une affection causée par des parasites du genre *Plasmodium* et transmise par des moustiques du genre *Anopheles*. Cette maladie provoque chaque année dans le monde la mort d'environ un demi-million de personnes, principalement des jeunes enfants et des femmes enceintes. Les inconvénients liés à l'utilisation d'insecticides (apparition de moustiques résistants, destruction de nombreuses autres espèces animales), la difficulté technique que représente la création d'un vaccin efficace, et l'apparition de parasites résistants aux médicaments antipaludiques existants, ont conduit la communauté scientifique à étudier les bases de l'interaction moustique/*Plasmodium* et à rechercher de nouvelles stratégies de lutte contre ce fléau.

Les virus de la dengue, Zika et du Chikungunya sont transmis par les moustiques du genre *Aedes*, eux aussi de plus en plus résistants aux insecticides. La moitié de la population mondiale est exposée au risque d'infection par ces virus. Il n'existe ni traitement spécifique, ni vaccin efficace contre ces maladies. Par ailleurs, de nouveaux virus transmis par les moustiques émergent régulièrement. Il est donc capital d'étudier les bases moléculaires de la transmission des virus. Pour l'anophèle comme pour *Aedes*, il existe une grande diversité dans la résistance naturelle des moustiques aux pathogènes humains. Il a été montré que cette résistance naturelle a en partie une origine génétique. Aussi, l'objectif de notre laboratoire est de mieux comprendre le fonctionnement des gènes de l'immunité des moustiques afin d'envisager des méthodes basées sur le renforcement de la résistance des moustiques des populations naturelles, ce qui permettrait de réduire la propagation de la maladie.

Le travail sur le parasite du paludisme humain, *Plasmodium falciparum*, nécessitant des laboratoires avec des niveaux de confinements élevés, de nombreuses équipes ont choisi de travailler sur des modèles murins du paludisme : *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. Cette démarche

scientifique implique donc l'utilisation de souris comme hôtes de parasites. D'autre part, les moustiques anophèles et Aedes femelles sont des hématophages obligatoires : elles ont besoin de repas sanguins pour être capables de produire des oeufs. Des souris sont donc également requises comme donneuses de sang pour le maintien des colonies.

Nous avons établi nos protocoles en conformité avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement :

- l'utilisation des souris ne peut être remplacée par la technique de repas sanguin sur membrane artificielle avec du sang humain ou animal. En effet, les repas sur membranes sont 2 fois moins efficaces que sur un animal, et techniquement trop contraignants à mettre en oeuvre pour les 80 lignées de moustiques que nous élevons.

- afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque souris est utilisée pour plusieurs repas sanguins non infectieux avec une période de récupération entre 2 repas pour lui permettre de reconstituer son stock de cellules sanguines. Nous adaptons le nombre de repas par lignée en fonction de leur utilisation. Nous avons aussi changé notre procédure d'infection des souris avec les parasites afin d'augmenter sa reproductibilité et de réduire le nombre de souris nécessaires pour les infections des moustiques.

- afin de limiter la douleur ou le stress, les souris sont élevées en groupe sociaux de 3-6 individus et leur milieu est enrichi avec des palets de papier et des balles de coton qu'elles dilacèrent pour construire leur nid. Les repas (non infectieux, infectieux ou infectants) se font sous anesthésie. Nous n'observons pas de réaction inflammatoire au niveau des piqûres et les souris ne présentent pas de signes de démangeaison au réveil. Le nombre de moustiques se nourrissant sur une souris est strictement contrôlé (200 femelles maximum) afin de limiter le prélèvement sanguin. Toute souris infectée est mise à mort à un stade asymptomatique du paludisme.

Par an, il est nécessaire d'utiliser environ 400 souris pour maintenir 80 (60-100) lignées différentes de moustiques et 300 souris pour les infections, soit un total de 3500 souris pour 5 ans.

13153 Les réseaux cérébraux impliqués dans la médiation émotionnelle de la douleur (Comportement de maladie (Harrison N. A., Brain structures implicated in inflammation-associated depression ; Curr Topics Behav Neurosci, 2016 ; DOI 10. 1007/7854_2016_3) font l'objet de nombreux travaux afin d'améliorer la prise en charge de pathologies lourdes. Notre équipe s'intéresse à ces réseaux par l'intermédiaire des noyaux para-sous-thalamique (PSTN) et calbindine (CbN) : ces noyaux, localisés dans l'hypothalamus postérieur sont à l'interface de plusieurs circuits de contrôle de l'appétit (Satiété, anorexie), de la médiation centrale du message douloureux et des centres du vomissement. Ils sont connectés au noyau central de l'amygdale, 'effecteur' de cette région cérébrale impliquée dans la réponse émotionnelle. Ils sont aussi connectés aux aires corticales insulaires impliquées dans l'intéroception, ainsi qu'au cortex gustatif (PSTN/CbN répondant à la valeur hédonique « liée au plaisir » des aliments).

Notre hypothèse est que ces structures de l'hypothalamus moduleraient l'expression comportementale en réponse à des facteurs hédoniques induisant normalement un « effet récompense ». Nous connaissons les circuits dits de la récompense (Ce stimulus est agréable, je m'en approche et j'en ai envie) ou au contraire d'évitement (Ce stimulus est mauvais, je le fuis ou je ne m'en approche pas). Le PSTN/CbN serait impliqué dans des réponses de 'non-récompense' : la consommation de cet aliment que je reconnais comme bon, ne me fait pas envie car je ne suis pas dans un état émotionnel ou physiologique propice.

Expérimentalement, l'activation ou l'inhibition de ces noyaux pourrait donc moduler la perception émotionnelle de conditions défavorables (Anxiété, douleur) afin d'en diminuer les effets sur le développement par exemple d'anorexie. Dans le cadre de traitements anti-cancéreux fortement émétiques, d'en diminuer la perception et/ou l'intensité aversive afin d'en faciliter l'acceptation. Dans certaines conditions, en lien avec ce qu'on appelle le 'renforcement négatif', ces noyaux pourraient être impliqués dans l'addiction.

Les objectifs de nos travaux sont de mieux comprendre l'organisation anatomique et fonctionnelle de ces structures, et de vérifier si des traitements non médicamenteux, tels que la stimulation

transcrâniennes (tDCs), connue pour son effet antidépresseur, modulent aussi l'activité de ces réseaux.

Il s'agira donc par traçage génétique d'étudier les connexions neurochimiques spécifiques (Tac1, CRH et Calbindin2) du PSTN/CbN, ainsi que d'analyser l'effet de son activation/inactivation par pharmacogénétique et optogénétique en réponse à des conditions expérimentales en lien avec la consommation de nourriture, l'anxiété, ou des réactions inflammatoires ou de nausées chimio-induites impactant la prise de décision. Pour cela nous injecterons chirurgicalement des vecteurs viraux AAV à des souris. Au bout de quelques jours, les neurones infectés sont transfectés pour les gènes d'intérêt, mais les particules virales ont été éliminées par la Souris qui peut alors être manipulée comme un organisme génétiquement modifié (OGM) classe 1. Des souris de souche C57BL/6 exprimant l'enzyme Cre sous la dépendance du promoteur des gènes de la tachykinine, du CRH ou de la Calbindine2 seront utilisées. L'approche *in vitro* ne peut être utilisée comme tentative de remplacement. En ce qui concerne la réduction du nombre d'individus, les effectifs de souris envisagées seront limités à ce qui est nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques fiables pour une publication des résultats, afin que la communauté scientifique puisse bénéficier des données obtenues et ainsi éviter une redondance avec des expérimentations ultérieures. Enfin, pour le volet raffinement, notre expérimentation prévoit un suivi rigoureux de l'état de l'animal et l'interruption de l'expérience au moindre signe de souffrance atteignant le niveau 3. Un total de 2020 souris mâles et femelles sera utilisé sur 3 ans.

13154 1- Contexte : Les thérapies existantes de la sclérose en plaques et de la colite auto-immune ne sont que peu efficaces. Le développement de ces pathologies repose sur l'activité pathogène d'une population immunitaire appelée lymphocytes T (LT). Dans ce cadre, la compréhension des mécanismes moléculaires régissant l'activité des LT a un intérêt certain pour le développement de nouvelles thérapies.

2- Objectifs du projet : Nous proposons d'analyser le rôle de la protéine X dans la fonction des LT dans des modèles murins bien établis de sclérose en plaques et de colite auto-immune. L'incidence et la sévérité de ces pathologies seront mesurées dans des lignées de souris déficientes pour la protéine X dans différents compartiments de LT. Nos expériences pourraient mettre en évidence un nouveau facteur orchestrant la pathogénicité des LT, représentant ainsi une forte avancée conceptuelle en immunologie, et révélant une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de ces maladies. Nous prévoyons que notre étude sera complète en 5 ans au maximum.

3-Balance dommages/bénéfices : Pour ce projet, nous proposons d'utiliser la souris, modèle pour lequel des protocoles expérimentaux bien établis permettent de reproduire fidèlement les symptômes de la sclérose en plaques et de la colite auto-immune chez les patients.

Les procédures de colite auto-immune sont de sévérité modérée. En revanche les procédures d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE, modèle murin de sclérose en plaques le plus couramment utilisé) sont plus sévères. En effet cette maladie, comme la sclérose en plaques humaine, conduit à une gêne importante mais temporaire, dans les déplacements. Dans ce cadre il est important de noter que nos expériences ont toutes une visée thérapeutique à moyen terme, justifiant ainsi l'utilisation de ces modèles précliniques.

4- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Nous allons tout d'abord effectuer un certain nombre d'expériences *in vitro*. Cependant, la validation de nos résultats nécessitera une série d'expériences *in vivo* pour mesurer la fonction de la protéine X dans des modèles d'auto-immunité *in vivo*. À notre connaissance, et malgré les progrès récents dans les domaines de la culture cellulaire et de la biologie computationnelle, l'étude de la pathologie ne peut actuellement pas être remplacée par des systèmes *in vitro* fiables. Nous utiliserons des modèles de pathologies très bien décrits dans la littérature, ce qui permettra un suivi précis de la sévérité de la maladie. Pour chacune des procédures expérimentales, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet est de 240. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents

permet de limiter au maximum toute souffrance animale et de quantifier précisément les symptômes des modèles auto-immuns étudiés. En particulier, les animaux atteints de sclérose en plaques seront traités par un antalgique en continu et auront accès à de l'alimentation gélifiée, placé au fond de chaque cage, pour faciliter l'alimentation et limiter le stress.

13155 1- Contexte : Il est désormais clair que la progression de certains cancers est indexée à leur écosystème, en particulier à la qualité des réponses immunitaires. Les cellules tumorales elles-mêmes influent sur le profil de ces réponses immunitaires, via l'expression de molécules membranaires ou secrétées. Toutefois les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans ces mécanismes sont mal définies. L'identification de ces mécanismes pourrait permettre la mise en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du mélanome.

2- Objectifs du projet : Nous proposons d'étudier le rôle des protéines nucléaires X, Y et Z, que nous avons récemment identifiées *in vitro* dans le mélanome humain, dans la croissance du mélanome et l'établissement du microenvironnement tumoral chez la souris. Pour ce faire, nous utiliserons des cellules de mélanome témoin ou déficientes pour X, Y ou Z, transplantées dans des souris normales ou immuno-déficientes, et mesurerons l'effet d'une immunothérapie par anti-PD1, qui est un traitement de référence pour les patients atteints de mélanome. Nos modèles d'étude constituent une opportunité unique de décrypter la régulation moléculaire de la biologie des cellules tumorales. Nous espérons de ce fait mettre en évidence de nouveaux rôles pour les protéines X, Y et Z dans l'écosystème tumoral, ainsi que découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer. Nous prévoyons que notre étude sera complète en 5 ans au maximum.

3-Balance dommages/bénéfices : Pour ce projet, nous proposons d'utiliser la souris, qui est le modèle animal le plus couramment utilisé pour l'étude du cancer, et pour lequel nous avons développé des modèles expérimentaux permettant de disséquer les fonctions précises des protéines X, Y et Z.

Le mélanome est un problème majeur de santé publique, pour lequel peu de traitements sont efficaces. Dans ce cadre l'utilisation d'animaux présente un intérêt majeur pour la découverte de nouveaux traitements et pourrait ainsi présenter un bénéfice majeur et rapide. Les procédures expérimentales de ce projet sont toutes de sévérité modérée.

4- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : Nous allons tout d'abord effectuer un certain nombre d'expériences *in vitro*. Cependant, la validation de nos résultats nécessitera une série d'expériences *in vivo* pour mesurer la fonction des protéines X-Y-Z sur la croissance tumorale. À notre connaissance, et malgré les progrès récents dans les domaines de la culture cellulaire et de la biologie computationnelle, l'étude de la croissance du cancer et la validation des cibles médicamenteuses potentielles ne peuvent actuellement pas être remplacées par des systèmes *in vitro* fiables. Pour chacune des procédures expérimentales, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet est de 190. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents permet de limiter au maximum toute souffrance animale. De plus, nous avons choisi d'utiliser des cellules tumorales dont la croissance ne provoque pas de douleurs importantes, et n'induit pas de phénomène de métastases, limitant ainsi les effets délétères du cancer.

13156 Le cartilage est un tissu au potentiel de réparation spontané très limité du fait de sa non vascularisation. Par conséquent, le traitement des lésions cartilagineuses articulaires est un problème de forte actualité clinique. Le procédé de réparation chirurgicale des lésions limitées du cartilage le plus prometteur consiste à prélever un échantillon de cartilage sur une zone non portante de l'articulation, à en extraire les cellules qui sont ensuite amplifiées en monocouche puis transplantées dans la lésion. Cette amplification en monocouche s'accompagne malheureusement d'une perte du phénotype des cellules et conduit à la formation d'un cartilage de mauvaise qualité dans la lésion. Ce phénomène appelé dé-différentiation peut être pallié en cultivant les cellules dans un hydrogel, ce qui permet de restaurer le phénotype des cellules.

L'objectif de ce projet est d'obtenir un reconstruit de cartilage constitué de cellules humaines enrobées dans un hydrogel afin de traiter des lésions limitées du cartilage articulaire. Plusieurs hydrogels ont été validés *in vitro* au laboratoire. Des chondrocytes articulaires humains enrobés dans un hydrogel seront implantés dans un bloc ostéochondral humain afin de mimer un environnement articulaire. L'ensemble [hydrogel + cellules + bloc ostéochondral] sera ensuite greffé en sous cutané chez la souris nude qui servira d'une part de réacteur physiologique pour la construction *in vivo* de cartilage articulaire humain et permettra d'autre part de tester la résistance du cartilage reconstruit aux frottements de la peau.

Nous utiliserons 3 groupes de 7 souris, soit 21 animaux au total.

Remplacement : La capacité des reconstruits de cartilage à résister aux forces de friction exercées par la peau de la souris sera évaluée. Par conséquent aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux.

Réduction : Les hydrogels que nous planterons chez la souris ont tous fait l'objet d'une étude *in vitro*. Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chances d'obtenir des résultats satisfaisants, reproductibles et statistiques.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans une animalerie avec un accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes seront observés quotidiennement. De plus, nous suivrons le poids corporel des animaux chaque semaine.

13157 Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe hétérogène de tumeurs (50 histotypes différents) affectant chaque année 4500 adultes et enfants, le décès survient dans près de 50% des cas car les médecins ne disposent que de chimiothérapies palliatives. Les deux chimiothérapies les plus couramment utilisées dans le traitement des sarcomes sont la doxorubicine et la gemcitabine. Elles induisent soit des cassures dans l'ADN soit des modifications de l'ADN qui conduisent à la mort de la cellule. Malheureusement tous les patients ne répondent pas très bien à ces traitements, il est donc important d'essayer d'améliorer les traitements existants, en leur associant par exemple des médicaments empêchant la réparation de l'ADN (inhibiteur d'ATR, d'ATM ou de la DNA-PK). Nous souhaitons donc tester l'efficacité de l'association entre une chimiothérapie standard avec différents inhibiteurs des voies de réparation.

Comme nous sommes localisés dans un centre de référence dans le traitement de ce cancer rare, nous avons donc la possibilité d'obtenir des tumeurs de patients et ainsi de pouvoir développer des lignées cellulaires et des souris greffées avec ces lignées. Les tests seront d'abord réalisés sur les cellules en culture et s'ils sont concluants, ils seront alors réalisés sur un modèle de souris greffée. Dans le cadre de ce projet nous souhaitons réaliser les tests sur deux lignées cellulaires différentes, les souris greffées seront traitées par différents médicaments seuls ou en association.

Ces expérimentations *in vivo* s'inscrivent dans un projet de recherche translationnelle qui vise à élargir l'éventail thérapeutique dans le traitement des sarcomes des tissus mous, elles sont obligatoires avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacement : les études des effets biologiques et pharmacologiques sont réalisées dans un premier temps sur des lignées cellulaires *in vitro* mais il est difficile de s'affranchir du modèle du petit animal, en effet le développement tumoral fait intervenir de nombreux mécanismes physiologiques et nous savons également que l'environnement tumoral joue un rôle important dans la réponse aux traitements.

- Réduction : le nombre de souris est limité au maximum, le but étant d'obtenir des données d'efficacité du médicament significatives.

- Raffinement : toutes ces expérimentations sont réalisées par du personnel qualifié, les animaux sont surveillés par le personnel de l'animalerie tous les jours et sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée et enrichie par des tunnels en polycarbonate

Naturellement, pour chaque procédure expérimentale sont mis en place des points limites adaptés, les souris sont surveillées, traitées pour la douleur si besoin et sacrifiées quand le point limite est atteint.

Ce projet nécessitera 528 souris sur 5 ans.

13158 L'épilepsie est la maladie neurologique la plus fréquente après la migraine. En effet, elle touche plus de 500 000 personnes en France et environs 50 millions dans le monde et constitue un problème de santé publique majeur. L'épilepsie se caractérise par une hyperactivité anormale du cerveau qui peut être généralisée ou focale. Parmi ces deux types d'épilepsies, 60% sont focales, c'est à dire que l'hyperactivité anormale n'est présente que dans une région bien localisée du cerveau. Ces épilepsies focales s'accompagnent de troubles cognitifs notamment sur la mémoire visuelle, émotifs, moteurs récurrents qui sont très invalidants pour les patients. Malgré de nombreuses avancées thérapeutiques, 60% de ces épilepsies résistent aux médicaments et parmi elles seulement 30% sont opérables. Il est absolument nécessaire de trouver d'autres traitements pour les épilepsies résistantes qui ne s'opèrent pas. Durant ces 10 dernières années, de nouvelles thérapies ont été testées pour ces épilepsies. Parmi elles, la stimulation électrique de structures profondes du cerveau a été proposée. Cette technique offre l'avantage d'être réversible (c'est à dire non définitive) et moins invasive que la chirurgie de résection. Des études expérimentales ainsi que des essais cliniques ont rapporté des résultats encourageants mais hétérogènes. Ces questions doivent donc être appréhendées au niveau préclinique dans un modèle d'épilepsie proche de la maladie humaine, comme le modèle macaque rendu épileptique. En effet, le macaque présente une organisation anatomo-fonctionnelle du cerveau très proche de celle de l'humain. L'injection d'une drogue dans une zone précise du cerveau est un modèle expérimental qui permet d'obtenir des crises d'épilepsie focales, transitoires, répétées sur au moins 4 heures, avec des caractéristiques très similaires à celles rencontrées chez l'humain. Le projet nécessite d'implanter deux électrodes, reliées à un stimulateur/enregistreur implantable, très semblable à celui utilisé chez les patients. Ce système permet à la fois d'enregistrer les signaux électriques dans la zone de la crise d'épilepsie, et également d'envoyer des signaux électriques de stimulation. Les crises épileptiques ayant des effets délétères sur la mémoire, un test de reconnaissance visuelle sera réalisé afin de vérifier l'intégrité ou l'altération de la mémoire tout au long de l'expérimentation. Pour tester l'efficacité de ce traitement, un maximum de 4 primates non humains seront inclus dans cette étude. Cet effectif a été réduit autant que possible mais est suffisant pour nous garantir l'obtention de résultats fiables (principe de réduction). Les animaux sont regroupés en fonction de leurs affinités, ils peuvent ainsi avoir des interactions sociales réconfortantes comme l'épouillage. Un programme d'enrichissement du milieu est assuré par le zootechnicien référent. Il a pour but de familiariser les singes aux expérimentateurs, de leur apprendre à coopérer pour les déplacements et pour les soins et enfin il a aussi pour but de diminuer l'ennui que peut générer la captivité. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et sera évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (principe de raffinement). Ainsi, nos résultats, de par la proximité entre l'humain et le primate non-humain, seront facilement transférables au patient, de sorte qu'il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou une simulation informatique (principe de remplacement). Ce projet préclinique vise donc à optimiser l'efficacité de la stimulation cérébrale profonde pour les patients épileptiques ayant des crises pharmaco-résistantes non-opérables

13159 Le muscle strié squelettique est un des organes les plus vascularisés. Le muscle normal adulte a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches. Ces précurseurs musculaires doivent développer des interactions spécifiques avec leur environnement pour assurer la réparation du muscle tout au long de la vie et en particulier avec les cellules vasculaires, qui permettent le couplage entre angiogenèse et myogenèse.

Les myopathies comme les dystrophies musculaires sont caractérisées par des lésions permanentes des myofibres engendrant un défaut des capacités de régénération du muscle. Des études précédentes ont montré un défaut dans l'organisation des vaisseaux dans ces pathologies.

Le programme de recherche vise à comprendre les rôles des cellules endothéliales dans la pathogénie de la myopathie de Duchenne. Les études utilisent la culture cellulaire, à partir de cellules humaines, et également de cellules murines. Ces expériences *in vitro* sont couplées à des expériences *in vivo*, nécessitant le recours aux animaux (souris). Si les interactions cellulaires sont analysées dans un premier temps *in vitro*, il est indispensable de valider leur importance au sein du tissu dans l'organisme. Le projet inclut l'analyse *in vivo* de l'angiogenèse, c'est à dire la formation de vaisseaux sanguins, dans les souris dystrophiques (et souris normales en comparaison) et le rôle des cellules myogéniques et des cellules inflammatoires dans ce processus. Le bénéfice du projet est de permettre une approche physiologique intégrée et des essais à l'échelle préclinique d'activateurs/ inhibiteurs des voies moléculaires identifiées pour tenter d'améliorer le muscle dystrophique. La procédure n'induit pas de phénotype dommageable aux animaux.

Le projet prévoit deux procédures, dont une première procédure de mises au point des analyses permettant d'ajuster le nombre d'animaux pour le projet.

Ce projet utilise 317 souris. Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux, remplacement : les expériences du projet venant à la suite de l'analyse *in vitro*, l'utilisation du modèle murin est incontournable. Un nombre minimum d'individus sera utilisé. L'expérience passée du laboratoire a permis d'établir des analyses statistiques. Chaque animal est utilisé pour deux injections, réduisant le nombre d'animaux par deux. La procédure 1 met en œuvre des mises au point d'analyses qui permettra également de réduire le nombre d'animaux utilisés (une expérience utilisée pour l'analyse de plusieurs paramètres).
- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : l'environnement des animaux sera enrichi. L'anesthésie sera employée pour éviter stress et douleur lors de l'expérience. Un suivi régulier des animaux sera réalisé en prenant en compte des points limites adaptés.

13160 Le traitement chirurgical des anévrysmes de l'aorte thoraco-abdominale nécessite un clampage de l'aorte thoracique descendante et induit une ischémie-reperfusion viscérale. Cette chirurgie se complique fréquemment d'une réponse inflammatoire systémique (SIRS) entraînant une atteinte pulmonaire et parfois une défaillance multiple d'organes (MOF).

D'un côté, la dysfonction endothéliale mésentérique semble jouer un rôle important dans les conséquences de l'ischémie-reperfusion viscérale. Ce phénomène complexe implique de nombreux acteurs comme les cytokines et les polynucléaires neutrophiles.

D'un autre côté, l'anévrysme de l'aorte est une maladie biologique centrée sur la présence du thrombus pariétal liée à une activité inflammatoire permanente. La présence des neutrophiles dans le thrombus anévrysmal est associée à un taux important de protéases responsables de la dégradation progressive de la paroi aortique aboutissant à sa dilatation.

Ainsi, la gravité du traitement d'un anévrysme de l'aorte thoraco-abdominale n'est peut-être pas due uniquement à l'ischémie-reperfusion viscérale liée au clampage aortique thoracique. L'état de base de l'activation inflammatoire du réseau artériel pathologique est certainement à prendre en compte dans l'induction des complications post-opératoires.

L'hypersensibilisation préalable des polynucléaires neutrophiles pourrait être un élément clé.

Le but de notre travail est de montrer que la présence d'un anévrysme de l'aorte, de par son caractère inflammatoire, pourrait potentialiser les conséquences de l'ischémie-reperfusion viscérale.

Nous proposons de garder un modèle expérimental chez le rat de clampage de l'aorte supra-coeliaque de 30min suivi d'une reperfusion viscérale de 90min, connue dans le laboratoire. Nous comparerons 4 groupes de 20 rats en fonction de la présence d'un anévrysme de l'aorte ou d'une ischémie-reperfusion viscérale, soit au total 80 rats.

Ce projet aborde pour la première fois le rôle potentiellement aggravant de l'activation des polynucléaires neutrophiles par le thrombus anévrysmal sur les conséquences de l'ischémie reperfusion viscérale. Ainsi, cette étude pourrait permettre de disposer d'un facteur pronostique biologique préopératoire d'aide à la prise en charge chirurgicale des anévrysmes de l'aorte thoraco-abdominale.

De plus, pour respecter l'éthique de l'expérimentation animale, nous respecterons la règle des 3R (raffiner, réduire, remplacer), grâce aux stratégies suivantes :

- Pour raffiner les aspects méthodologiques per- et post-opératoires et de la variabilité inhérente au modèle expérimental ; des rats mâles wistar de 300gr seront nécessaires. Les animaux seront hébergés aux normes requises et un enrichissement (plaques de cellulose vierge et des maisons en carton) est mis en place. Enfin, une anesthésie (Ketamine/Xylazine) et une analgésie (Buprénorphine) adéquates seront mises en place pour chaque animal en fonction de chaque type de procédure. Pour chaque procédure, des points limites seront mises en place.

- Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude nous réaliserons en même temps des études sur des vaisseaux isolés (artériographie sur des artères mésentériques) et des analyses anatomiques (histologie, immunohistochimie) après leur euthanasie. De plus, nous avons réalisé des tests statistiques appropriés (test de STUDENT) et en fonction des données présentes sur la réalisation du modèle expérimental pour calculer le nombre de rats nécessaire.

- Remplacement : ce projet ne peut pas faire l'objet de remplacement par d'autres modèles expérimentaux n'impliquant pas d'animaux vivants, devant la complexité de la physiologie de l'ischémie reperfusion viscérale.

Ainsi, cette étude pourrait permettre de disposer d'un facteur pronostique biologique préopératoire d'aide à la prise en charge chirurgicale des anévrysmes de l'aorte thoraco-abdominale.

13161 Le cancer du sein est l'un des cancers les plus fréquents à travers le monde et le plus fréquent chez la femme. Chaque année, 1,3 millions de nouveaux cas sont diagnostiqués et 450 000 patients (très majoritairement des femmes) décèdent de cette maladie. Ces données rappellent l'importance de poursuivre les recherches, afin de lutter contre ce fléau.

Le dépistage par mammographie permet la détection de tumeurs de façon précoce, bénignes, et parfois curables par simple chirurgie. Néanmoins, dans de nombreux cas lors de sa découverte, la tumeur a déjà progressé à un stade malin et s'est propagée à travers l'organisme. Le traitement de tumeurs malignes fait appel à des stratégies complémentaires dont la chimiothérapie et/ou la thérapie hormonale. Malheureusement, la résistance de certaines cellules cancéreuses à ces thérapies provoque des rechutes rapides et constitue un défi clinique majeur.

La résistance des tumeurs mammaires au traitement repose sur l'existence d'une sous-population de cellules tumorales, les cellules souches cancéreuses, la racine de la tumeur. Tout comme des cellules souches qui participent au développement et à la régénération d'un tissu sain, les cellules souches cancéreuses participent à la tumorigénèse et à la régénération de tumeurs suite aux thérapies. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui participent au contrôle des cellules souches normales et cancéreuses est donc d'un intérêt majeur en oncologie. Notre projet vise à mettre en évidence de tels mécanismes afin d'identifier de nouvelles vulnérabilités de cellules souches cancéreuses qui pourraient être cibler dans de futurs traitements.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunocompétent et immunodéprimé afin d'y implanter des cellules tumorales de souris (modèle syngénique) ou humaines. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. De notre côté nous nous attachons à bien définir le projet et sa pertinence comme le stipule la règle des 3R. En effet, avant de réaliser les procédures, des études préliminaires ont été réalisées afin de remplacer chaque fois que cela est possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro*. A ce stade du projet, l'utilisation de modèles animaux reste inévitable puisqu'aucun modèle suffisamment précis n'est disponible pour étudier cette pathologie et sa réponse aux traitements. L'efficacité d'un nouveau traitement passe nécessairement par ces études

in vivo et l'intérêt d'avoir un modèle, orthotopique et reproductible pour bien appréhender l'efficacité de nouvelles molécules et ce dans le même environnement. Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable. Au total 686 souris au maximum seront nécessaires pour cette étude. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'ils pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Pour cela des soins pré-, per- et postopératoires adéquats seront réalisés. Toutes les interventions sont réalisées sous anesthésie générale et des traitements analgésiques sont systématiquement utilisés pour prévenir toute douleur.

13162 Le vieillissement des populations dans le monde pose le défi sociétal de la prévention de la perte d'indépendance. Ces dix dernières années, le concept de fragilité a été créé pour identifier les personnes âgées à risque de perte d'indépendance et susceptibles de bénéficier d'interventions préventives. En effet, l'état « fragile » est dans sa définition réversible.

L'altération de la fonction musculaire squelettique lors du vieillissement est nommée sarcopénie. La sarcopénie se définit selon une faible masse musculaire, un ralentissement de la vitesse de marche et une diminution de la force (dynapénie). La force est approchée par la force de préhension. On parle de dynapénie pour une force de préhension inférieure à 30 kg pour un homme et 20 kg pour une femme. Le seuil défini pour parler de vitesse de marche lente varie entre 0,8 et 1 m/s selon les distances parcourues, le type de départ (arrêté ou lancé) et les populations étudiées.

Si la force et la vitesse sont assez simples à mesurer, les instruments cliniques d'évaluation de la masse musculaire sont assez réduits, simplement anatomiques, et le contenu en graisse intramusculaire, ainsi que l'architecture musculaire, sont mal évalués.

L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) peut répondre à cet objectif mais une adaptation des séquences d'imagerie au muscle squelettique est nécessaire. En effet, de nos jours, les séquences d'observation musculaire sont purement anatomiques. On peut étudier le volume musculaire, mais il n'est pas possible aujourd'hui de réaliser des mesures plus précises d'évaluation de la qualité musculaire. Egalement, le muscle est toujours étudié à l'état de repos, alors que des études réalisées pendant un effort musculaire renseigneraient davantage sur la qualité du muscle.

L'imagerie de la fragilité est une voie prometteuse à l'heure où un nombre croissant de traitements de la fragilité est proposé qu'ils soient médicamenteux (ciblant la sarcopénie) ou non-médicamenteux (pour la fragilité). Ainsi, notre projet vise à développer des séquences IRM permettant d'obtenir des informations anatomiques et fonctionnelles sur les muscles. L'étude sera d'abord réalisée sur le muscle de la jambe (gastrocnemius) du rat. Ce muscle sera électro-stimulé afin d'en obtenir la contraction et de pouvoir obtenir des images dans cet état. Enfin, cette étude sera menée sur des animaux jeunes dans un premier temps, des rats portant des tumeurs cérébrales (modèle de sarcopénie), puis des rats âgés dans le but de comparer la sensibilité des nouvelles séquences IRM pour la détection des muscles vieillissants. Pour ce faire, le nombre total d'animaux envisagé pour les 5 prochaines années est de 140 animaux, 90 jeunes ainsi que 50 âgées. Cinquante animaux sains seront nécessaires lors des étapes de mises au point des techniques (les rats seront imagés plusieurs fois avec un minimum de quatre jours entre chaque examen). Ces animaux serviront aussi comme contrôles lors du suivi du modèle tumoral. Cette démarche permet de limiter le nombre d'animaux.

Remplacement : Le modèle animal est indispensable à cette étude afin de développer des méthodes et de les valider avant tout transfert à l'humain.

Les procédures expérimentales décrites dans le projet ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, car nous voulons étudier le muscle en fonctionnement.

Réduction : Le nombre total d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables.

Raffinement : Les animaux seront gardés dans des cages de 4 (ou de 2 pour les rats âgés), contenant des bâtonnets de bois à ronger, matériaux de construction de nid, coton, maisonnette, tubes en carton, de la paille, de la nourriture et de l'eau à volonté. Si certains animaux entrent en état de souffrance, ils pourront être séparés et placés dans des cages individuelles. De plus, l'administration d'un analgésique pourra être envisagée. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement.

13163 La myopathie myotubulaire (XLMTM ou MTM) est une maladie musculaire de l'enfant caractérisée par une faiblesse profonde apparaissant au début de la période néonatale avec de sévères handicaps (y compris la dépendance au fauteuil roulant et au respirateur artificiel) et un décès prématuré. Son incidence est estimée à 1/50 000 naissances de garçons. Un des gènes impliqués dans le développement de cette maladie a été décrit et un modèle de souris transgénique (souris « knockout » ou KO), basé sur la mutation de ce même gène a été créé. Ce modèle reproduit fidèlement les symptômes humains.

Le projet consiste à évaluer dans ce modèle de souris génétiquement modifiées, l'effet bénéfique de nouveaux candidats-médicaments sur la réversion des symptômes musculaires associés à cette myopathie tels que l'hypotonie et la faiblesse musculaire.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 600 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R :

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour étudier l'impact d'un gène sur un organisme dans sa globalité. A ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : Le raffinement sera obtenu par la mise au point de procédures rigoureuses, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, le suivi des signes cliniques et la détermination des points limites dont certains, spécifiques à ce modèle, prennent en considération l'atteinte musculaire, les difficultés respiratoires et la douleur.

Dans ce projet, le raffinement sera également obtenu par une surveillance accrue des animaux :

Les souris présenteront une faiblesse musculaire, donc l'accès à l'eau et à la nourriture sera facilité. Les souris seront surveillées quotidiennement ; le niveau de douleur et de paralysie seront déterminés à l'aide d'une échelle d'évaluation spécifique à l'espèce et à la pathologie. Les mesures appropriées seront prises pour réduire tout inconfort ou toute douleur qui se développerait (par exemple: traitement par un analgésique).

13164 Le diabète est un problème majeur de santé publique dans le monde. En France, 5% de la population est affectée par cette pathologie, soit plus de 3 millions de personnes. Les différentes formes de diabète se caractérisent par des taux élevés de glucose dans le sang. Dans le cas du diabète de type 1, cette hyperglycémie est causée par un défaut de production d'une hormone du pancréas, l'insuline. Dans le cas du diabète de type 2, l'insuline est produite mais son efficacité est amoindrie dans le tissu adipeux et musculaire, ce qui cause une résistance à l'insuline et est responsable de l'hyperglycémie.

Le diabète de type 1 résulte d'une activation anormale du système immunitaire qui est responsable de la destruction des cellules pancréatiques productrices d'insuline. De ce fait, le diabète de type 1 est considéré comme une maladie auto-immune. C'est une maladie mortelle si les patients ne peuvent compenser la perte de leur propre production d'insuline par des injections quotidiennes d'insuline synthétique. Les raisons du dérèglement du système immunitaire sont peu connues, mais regroupent probablement une combinaison de facteurs génétiques, infectieux et environnementaux.

Au début des années 90, une nouvelle catégorie de pathogènes a été associée à des maladies auto-immunes : ce sont les rétrovirus endogènes. Ils se sont intégrés dans le génome humain au

cours des millions d'années d'évolution, et ils représentent actuellement environ 8% de notre génome. La protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène humain (HERV) de la famille W, nommée HERV-W-Env, est impliquée dans le développement de la Sclérose en plaques (SEP) qui est aussi une maladie auto-immune. Cette protéine HERV-W-Env a également été détectée chez des patients atteints de diabète de type 1, dans leur sérum et dans les lésions pancréatiques. HERV-W-Env pourrait donc être impliqué dans la survenue de certains cas de diabète.

Pour tester cette hypothèse, un modèle animal est nécessaire pour savoir si la protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène HERV-W (nommée HERV-W-Env) peut entraîner le développement d'une autoimmunité et d'un diabète de type 1. Le modèle choisi repose sur l'injection de peptides immunogènes de l'insuline en association avec la protéine HERV-W-Env. Ce modèle a déjà été décrit dans un modèle de SEP et dans cette étude, il sera adapté au diabète de type 1.

Dans le cadre du respect des 3R pour cette étude sur le diabète, le « remplacement » a été permis grâce à des études préliminaires confirmant l'implication de HERV-W-Env dans le dysfonctionnement des cellules pancréatiques *in vitro*. La « réduction » du nombre d'animaux est possible en réalisant les expériences de manière successive et non parallèle dans le but d'ajuster les protocoles en fonction des résultats précédents. Il est prévu d'utiliser 80 souris dans ce projet qui durera au maximum 2 ans. Des personnes qualifiées seront en charge d'apporter les soins adaptés aux animaux et veilleront à leur bien-être afin d'assurer le « raffinement ». En particulier, ces personnes seront attentives aux symptômes liés à la survenue d'un diabète. Des points limites précoces et spécifiques au diabète ont été définis. Les animaux font l'objet d'un suivi individuel régulier (glycémie, poids, comportement) et des points limites sont associés à ces paramètres. Le protocole sera interrompu dès l'atteinte d'un de ces points limites. De plus, une combinaison d'enrichissements variés est utilisée en alternance tous les 15 jours pour favoriser le bien-être des souris (tunnel en carton, fibres de coton, plaques de cellulose, igloo PVC, briques de peuplier, lanières de papier).

13165 Les moustiques constituent une nuisance majeure et un impact croissant sur la santé humaine et animale par leur capacité à transmettre des pathogènes responsables d'affections virales (Dengue, Fièvre Jaune, Chikungunya, Zika) ou parasitaires (paludisme, filariose) pour lesquelles peu de moyens thérapeutiques sont disponibles ou accessibles.

La lutte contre les moustiques est une stratégie essentielle pour limiter la transmission de ces « maladies vectorielles ». L'approche la plus rationnelle est l'utilisation d'insecticide. Cependant de nombreuses espèces de moustiques sont devenues résistantes au nombre très limité d'insecticides disponibles. Dans la quête vers le développement de nouvelles stratégies ou molécules pour contrôler les populations de moustiques, l'efficacité « insecticide » de composés connus pour leur activité filaricide est en cours d'étude.

L'objectif du présent projet est de comprendre les bases biologiques d'une activité insecticide *in vivo* de longue durée, de composés filaricides, qui a été décrite chez l'homme infecté par des filaires en 1991, et dont les bases biologiques n'ont jamais été élucidées. Cette étude ne peut donc pas être réalisée *in vitro*. Il existe très peu de modèle animaux-filaires. Nous utiliserons un modèle d'infection de souris par une filaire spécifique de rongeur qui a déjà été décrit et utilisé efficacement pour évaluer de nouveaux filaricides. La première partie du projet sera de valider la pertinence du modèle souris-filaire pour reproduire l'activité insecticide longue durée décrite chez l'homme infecté par des filaires et traités par des filaricides. Pour cela, des souris infectées par la filaire murine *Litomosoides sigmondontis* seront traitées ou non avec un agent filaricide. En parallèle, deux cohortes de souris non infectées seront utilisées comme contrôle : l'une sans aucun traitement, la seconde traitée avec agent filaricide. L'activité insecticide déclenchée sera évaluée en faisant piquer chaque souris par un lot de moustiques produits au laboratoire, à intervalle régulier après le traitement filaricide ; le taux de mortalité induite chez les moustiques sera déterminé chaque jour après pique, avec un suivi sur 30 jours, correspondant à la durée de vie maximale des moustiques en condition d'insectarium.

La seconde partie du projet abordera l'analyse du processus insecticide. Se basant sur les conditions définies dans la première partie du projet, différents composants sériques de la souris

seront purifiés et leur activité insecticide estimée par gorgement artificiel sur membrane à des lots de moustiques produits au laboratoire. Pour ce faire les fractions du sérum des souris tests et contrôles seront ajoutées à des globules rouges et présentées aux moustiques dans des petits flacons équipés à leur base d'une membrane au travers de laquelle les moustiques peuvent piquer et absorber le mélange globules rouges et fraction sérique.

Afin de se conformer à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) et en considérant la taille des échantillons nécessaire et suffisante pour une bonne interprétation des résultats, après avis d'un biostatisticien, nous avons déterminé que la première partie du projet utilisera un maximum de 360 souris BALB/c (femelles âgées de 5 semaines) sur une période maximale de 18 mois. La seconde partie du projet qui s'étalera sur une période de 42 mois devrait nécessiter au maximum 500 souris. L'ensemble du projet utilisera donc 860 souris sur une durée de 5 ans. L'infection par les filaires et les traitements filaricides ou placebo se feront par une seule injection sous-cutanée. L'espèce de filaire utilisée est non létale pour la souris, qui en absence de traitement résorbe l'infection par les microfilaires dans les 100 jours. L'exposition des souris aux piqûres de moustiques se fera sur souris anesthésiées. En particulier, pour faciliter le réveil rapide des souris après anesthésie, un système de raffinement permettant de chauffer les cages des souris sera utilisé. La sévérité des deux procédures, notamment l'exposition répétée aux piqûres de moustique est modérée. Enfin, des points limites (stress, perte de poids) ont été définis pour limiter la souffrance animale.

13166 « Synucléinopathie » est le terme regroupant différentes maladies neurodégénératives humaines dont la maladie de Parkinson (MP), les démences à corps de Lewy et l'atrophie multisystémisée. La caractéristique commune de ces pathologies neurodégénératives est une accumulation anormale de la protéine α -synucléine sous une forme aberrante dans les cellules du système nerveux central. L'accumulation de l' α -synucléine est impliquée dans la mort des neurones qui est observée dans certaines régions particulières du cerveau chez les patients atteints de ces maladies. Parmi ces maladies, la MP est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente et ne possède à ce jour aucun traitement curatif. Elle est caractérisée par la perte extensive des neurones produisant un neurotransmetteur appelé dopamine et l'accumulation de l' α -synucléine dans les neurones du cerveau. Ces accumulations ont reçu le nom de corps de Lewy. Nos travaux ont montré que cette accumulation se propage le long du système nerveux à mesure que la maladie progresse. Les symptômes sont caractérisés par des problèmes locomoteurs très lourds mais également non moteurs. Développer des outils thérapeutiques de manière à enrayer le développement de cette maladie chez les patients est un enjeu de santé publique majeur aujourd'hui.

Une des pistes est de trouver des stratégies pour réduire la toxicité de l' α -syn. On sait qu'elle subit une agrégation accélérée en présence de membranes riches en lipides, comme celle de nos neurones. Cette accélération perturbe les vésicules contenant la dopamine, conduisant préférentiellement à la mort des neurones à dopamine.

NFE2L1 est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation et la survie des neurones dopaminergiques. En condition pathologique, NFE2L1 est sous-régulé ce qui entraîne une sensibilité des neurones dopaminergiques au stress oxydatif, conduisant à leur mort.

Notre hypothèse est que NFE2L1 pourrait atténuer la neurodégénérescence médiée par l' α -synucléine en induisant l'expression de protéines neuroprotectrices.

Pour cela, nous déterminerons les effets de l'expression de NFE2L1 dans un modèle *in vivo* de souris C57BL6/J inoculées avec des corps de Lewy de patients atteints de la MP en utilisant des études histologiques des cerveaux. Ce projet est donc d'intérêt pour toute pathologie liée à l' α -synucléine, et permettra donc de démontrer que l'utilisation de NFE2L1 est une cible thérapeutique valide pour les synucléinopathies.

Notre projet se déroulera en deux phases 1) une étude pilote avec 2 groupes de 5 animaux soit 10 animaux qui permettra de déterminer la sensibilité de NFE2L1. Cet effet sera mesuré par des analyses histologiques 2) les données recueillies nous permettront de mener le restant de l'étude sur 7 groupes de 12 animaux, soit 84 dans les conditions optimales. Cette stratégie nous permettra de réduire le nombre des animaux à un total de 94. Cette stratégie nous permettra de respecter le

R de réduire tout en ayant des groupes suffisamment conséquents pour pouvoir avoir des statistiques solides.

Notre approche expérimentale sera donc une injection stéréotaxique de Corps de Levy et/ou de NFE2L1. Après un temps suffisant pour permettre la propagation de l' α -synucléine, les cerveaux seront prélevés pour des analyses histologiques.

Pour le respect du R de remplacer, la mesure de la synucléinopathie et du potentiel traitement ne peut se faire que sur des animaux. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté.

Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

13167 L'asthme est une maladie très fréquente des voies respiratoires qui touche 6 à 20% de la population des pays d'Europe occidentale. Le terme « d'asthme sévère » s'applique aux patients présentant un asthme dont le contrôle est impossible malgré des traitements inhalés à fortes doses, dont l'observance et la technique d'inhalation est bonne, et malgré une gestion optimale des comorbidités. Un des besoins non couverts dans l'asthme sévère est la prévention efficace des exacerbations. Ces exacerbations sont des épisodes caractérisés par une majoration des symptômes d'essoufflement, de toux, de respiration sifflante ou d'oppression thoracique et par une diminution de la fonction respiratoire. L'asthme est caractérisé par une hyperréactivité, une inflammation et un remodelage bronchique. Les modifications structurales, que l'on désigne remodelage bronchique, incluent entre autre des altérations de l'épithélium, des modifications de la matrice extracellulaire, un épaississement de la membrane basale, une hyperplasie des cellules à mucus, et une augmentation de la taille du muscle lisse bronchique (MLB).

La taille du MLB a une valeur pronostique car son augmentation est associée à une fonction respiratoire dégradée et à un taux d'exacerbation plus élevé. Une des caractéristiques majeures du MLB d'asthmatique est l'excès de prolifération cellulaire, démontrée *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les mécanismes d'un tel remodelage restent inconnus. En 2007, le laboratoire a pu mettre en évidence un lien entre la taille du MLB et l'augmentation de la masse mitochondriale. L'augmentation de la biogenèse mitochondriale permet ainsi la prolifération accrue des cellules de MLB. Ces résultats démontrent la présence d'un dysfonctionnement mitochondrial au sein du MLB chez les patients asthmatiques.

Une des voies principales de régulation la biogenèse mitochondriale passe par le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM), qui est un des composants du complexe impliqué dans la réplication de l'ADNmt. Les taux de TFAM peuvent contrôler le nombre de copies d'ADN mitochondriale.

Le projet actuel a pour objectif de diminuer *in vivo* l'expression du gène Tfam chez les souris dans le modèle d'asthme chronique allergique. Le but de la modification d'activité du gène est d'évaluer les conséquences de diminution de l'expression du gène Tfam sur le remodelage bronchique de l'animal.

Dans notre projet, nous accordons la plus grande importance au respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Les mesures mises en place sont les suivantes :

1) Réduire : se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons 200

souris et nous réaliserons de multiples études *ex vivo* sur différents organes et selon différentes techniques.

2) Raffiner : pour diminuer la souffrance et l'angoisse des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les instillations, analgésie et anesthésie pour les mesures des paramètres respiratoires, raffinement des conditions d'hébergement, vérification par le comité sur le bien-être des animaux) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer : En raison de la complexité de la communication intercellulaire menant à la maladie, il n'existe pas de modèle *in vitro* qui permet d'estimer l'évolution du remodelage bronchique dans l'asthme suite au blocage du gène clé de la biogénèse mitochondriale. L'utilisation du modèle d'asthme chroniques murin dans nos études nous donnera une meilleure compréhension des phénomènes.

13168 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie se caractérise sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Ces symptômes ont été associés à une perte de neurones produisant la dopamine au niveau cérébral. Les traitements actuels visant à soulager ces symptômes ne sont pas optimaux. Le développement de nouveaux outils thérapeutiques est donc essentiel.

Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux de la maladie de parkinson (MP) chez la souris qui permettent de reproduire les symptômes moteurs typiques de cette maladie ainsi que la perte de neurones dopaminergiques et d'évaluer les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins bien décrits dans la littérature.

Les modèles que nous utilisons permettent d'évaluer l'effet de composés pharmacologiques sur les composantes comportementales (l'amélioration des symptômes moteurs) et cellulaires (effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques) de la MP chez la souris.

Ces modèles sont générés dans le cadre d'une activité pré-clinique sur des composés thérapeutiques avec un nombre de 3 études par an, comprenant 100 souris par étude (soit un total de 1500 animaux sur 5 ans).

Ces modèles sont basés sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire via l'injection intracérébrale soit d'une neurotoxine, la 6-OHDA (lésion totale) soit d'un virus (lésion partielle).

Les approches mises en œuvre sont une chirurgie (stéréotaxie) peu douloureuse et l'administration chronique d'un traitement. Elles peuvent concernées des souris normales et des souris transgéniques. Le bénéfice attendu est une meilleure compréhension des effets d'un traitement expérimental chronique à différentes doses dans la MP mesurés grâce à différents tests comportementaux faisant appel au comportement moteur.

Notre activité de recherche pré-clinique nous amène à tester différents composés thérapeutiques sur ce modèle avec 3 études par an, comprenant 100 souris par étude. Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 20 animaux par groupe soit 100 souris par étude incluant les groupes expérimentaux (4 doses différentes de composé) et leur contrôle. L'analyse des effets pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement par des modèles *in vitro* actuels ne permettrait pas de répondre à notre question. Pour le respect du R de raffiner, les procédures prévues sont légères. Nous avons vérifié par ailleurs qu'aucune donnée actuelle n'indique que les molécules testées soient susceptibles d'entraîner une souffrance chez les animaux. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments

d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire.

13169 Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules est la principale cause de décès par cancer dans le monde. La majorité des patients présentent un stade avancé de la maladie au moment du diagnostique, et sont traités par chimio/radiothérapie. Ces traitements sont de plus en plus souvent associés avec des thérapies ciblées. Toutefois, en dépit des traitements, la survie à cinq ans n'est que de 15%, ce qui est principalement dû aux métastases. Des études épidémiologiques ont analysé un lien potentiel entre les infections respiratoires, l'inflammation chronique et le cancer du poumon. Dans plusieurs modèles de tumeurs, il a été montré que les récepteurs de la famille Toll-Like (TLR) sont liés à l'inflammation. Certains TLR reconnaissent des acides nucléiques, notamment le TLR7, qui est un récepteur de l'ARN simple brin. La reconnaissance des virus par le TLR7 peut ainsi induire une forte inflammation pulmonaire.

Parmi les virus respiratoires retrouvés en pathologie humaine, le virus influenza A et le virus respiratoire syncytial (RSV) sont fréquemment incriminés. Nous avons préalablement démontré que TLR7 est exprimé par les cellules tumorales pulmonaires dans des cohortes de patients ayant un cancer pulmonaire, et qu'une forte expression de TLR7 est de mauvais pronostic, et est corrélée avec une faible réponse à la chimiothérapie. Nous avons aussi montré que la stimulation de ce récepteur par un ligand synthétique à un effet pro-tumoral.

Sur la base de ces données, nous émettons l'hypothèse que les infections virales pulmonaires induisent une activation de TLR7, et par conséquent induisent un effet pro-tumoral et une résistance aux traitements anti-tumoraux. Nous suspectons ainsi que les infections virales peuvent avoir un impact sur le comportement de la tumeur (progression, métastases et réponse aux traitements) ainsi que sur la réponse immunitaire anti-tumorale (composition, activation et fonction des cellules immunitaires).

Le but de ce projet est mettre au point le modèle d'étude de la progression tumorale pulmonaire intrapulmonaire en réponse à un agoniste de TLR7, afin de pouvoir caractériser par la suite l'influence des infections virales sur la progression tumorale, l'incidence des métastases et la réponse à la chimiothérapie.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris C57Bl/6 albinos. Le nombre total des souris utilisées sera de 1830 : 240 souris dans la procédure 1 de mise au point du modèle de tumeur orthotopique, 150 dans la procédure 2 pour caractériser les effets des injections de virus, dans la procédure 3, 720 souris afin de déterminer l'effet du virus sur la progression tumorale et l'apparition des métastases et l'agoniste de TLR7, dans la procédure 4, il y aura également 720 souris albinos pour caractériser la réponse immunitaire anti-tumorale dans les souris ayant été infectées par les virus avec ou sans traitement avec l'agoniste de TLR7.

La règle des 3R sera appliquée :

Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation : Les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles.

Refine (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : des points limites ont été établis, pour définir à quel moment sacrifier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

Replace (Remplacer) les modèles animaux : pour ces expériences, les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions les effets d'infections virales sur la progression des tumeurs pulmonaires dans un organisme où le système immunitaire joue un rôle important. Ceci ne peut donc pas être étudié *in vitro*.

13170 Les neurones, regroupés en réseaux, communiquent entre eux via leurs connexions synaptiques. Cette communication entre neurones est responsable d'un flux d'activité synaptique permanent présent au niveau de chaque neurone mais aussi au niveau du cerveau dans son ensemble. Ces

activités synaptiques de fond – selon leur patron temporel, leur amplitude ou leur localisation – déterminent l'état interne du cerveau (veille, sommeil, activité cognitive) à chaque instant. Lors d'un coma, ces activités électriques spontanées que l'on peut enregistrer en surface du cerveau (activité électroencéphalographique ou EEG) se déstructurent. L'activité EEG cliniquement la plus péjorative, associée aux formes de comas les plus profonds, est associée à un tracé plat ou isoélectrique. Ce tracé plat reflète un arrêt complet des activités synaptiques de fond et entraîne une perturbation des processus conscients. Il peut être observé en cas d'hypothermie sévère, d'intoxication médicamenteuse ou de façon plus préjudiciable, lors d'anoxies prolongées ou de traumatismes cérébraux. Un état cérébral isoélectrique peut également être induit dans un contexte thérapeutique, par l'administration de doses élevées d'anesthésiques, afin d'interrompre un état de mal épileptique hyper-réfractaire aux traitements conventionnels. Quelle que soit son étiologie, le coma isoélectrique a longtemps été considéré comme le reflet d'un cerveau a-réactif, incapable de traiter des informations extérieures en raison d'un effondrement de l'excitabilité neuronale et des fonctions synaptiques.

Cependant, l'absence d'activité électrique détectable en surface du cerveau, reflet global de l'arrêt des activités synaptiques générées au sein des réseaux corticaux, ne permet pas de conclure quant à l'état fonctionnel des neurones individuels et leur capacité à traiter des informations, internes ou environnementales, au cours d'un état isoélectrique. Une exploration électrophysiologique des neurones individuels chez l'homme n'étant pas réalisable, nous avons développé une nouvelle préparation animale *in vivo* totalement privée d'activité électrique cérébrale endogène (c'est-à-dire présentant de façon persistante un EEG plat) afin de réaliser une étude systématique des propriétés fonctionnelles persistantes d'un cerveau placé dans un état de coma profond ? Comment sont modifiées les propriétés d'excitabilité des neurones individuels ? Les neurones peuvent-ils toujours communiquer entre eux ? Le cerveau conserve-t-il sa capacité à intégrer et traiter des informations issues de l'environnement ?

Nous aborderons ces questions en réalisant des enregistrements électrophysiologiques multi-échelle chez des rats (de souche Sprague-Dawley ou Wistar) placés dans un coma profond. Nous analyserons l'impact de cet état cérébral extrême sur les propriétés d'excitabilité des neurones ainsi que sur leur réactivité à des stimulations sensorielles.

Nous suivrons la règle des '3 R' dans la conduite de nos expériences. Réduction du nombre d'animaux : afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons effectué une planification rigoureuse des expériences en testant au préalable leur faisabilité, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques. Raffinement de la méthodologie: un soin tout particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur ou du stress des animaux grâce à une surveillance constante des paramètres physiologiques (EEG, fréquence cardiaque, température, pCO₂, SpO₂) et un protocole d'intervention spécifique (utilisation appropriée d'anesthésiques généraux ou locaux et myorelaxants) pour chaque indicateur de souffrance (sensibilité au pincement de la patte, réflexes musculaires, variation de température ou de fréquence cardiaque, modification du patron d'activité EEG). Remplacement des modèles animaux : nous réaliserons sur ordinateur des modèles biophysiques des neurones enregistrés nous permettant de valider certains de nos résultats sans avoir recours à l'utilisation d'animaux vivants.

Nous estimons qu'environ 450 animaux seront nécessaires à la réalisation de ce projet d'une durée de 5 ans.

L'aboutissement de ce projet devrait permettre de caractériser avec précision - et possiblement à réévaluer - les véritables capacités fonctionnelles des neurones et circuits neuronaux lors de comas profonds et permettre ainsi une prise en charge éclairée et mieux adaptée des patients.

13171 Les maladies métaboliques, qui regroupent un ensemble de pathologies telles que l'obésité ou le diabète de type 2, constituent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale.

Outre le surpoids, l'obésité, se caractérise par des phénomènes locaux et systémiques (par exemple au niveau circulatoire) qui interviennent dans le développement même de la maladie et de ses complications. Par exemple, une inflammation chronique (dite de « bas-grade ») est fréquemment retrouvée chez les patients atteints d'obésité, et ce tant au niveau systémique que tissulaire (tissu adipeux, foie, muscle et la barrière intestinale). Cette inflammation est impliquée dans le développement et/ou le maintien de la résistance à l'insuline, marqueur principal du diabète de type 2. Entre outre, l'obésité est également associée à une altération de la composition et de la fonctionnalité des bactéries qui peuplent notre intestin, appelé microbiote intestinal. L'une des conséquences de ces altérations du microbiote intestinal est une diminution du nombre d'espèces bactériennes, qui a été associée à de nombreuses reprises dans la littérature à un contexte pathologique (insulino-résistance, accumulation viscérale du tissu adipeux, inflammation). Ainsi, la modulation de l'inflammation et de la richesse du microbiote intestinal offre des perspectives thérapeutiques et scientifiques prometteuses.

Par exemple, l'action d'un anti-inflammatoire local, la mesalamine (5-ASA), dérivé de l'aspirine et traitement de première ligne des maladies chroniques de l'intestin (rectocolite hémorragique, maladie de Crohn), a montré un effet bénéfique sur les paramètres altérés lors du développement du diabète de type 2 : glycémie à jeun, l'insulinémie à jeun, ainsi que la tolérance au glucose et à l'insuline lorsqu'administrée à des souris.

D'autre part, la richesse du microbiote intestinal est fortement associée à la consommation de fibres alimentaires. Les fibres, non digestibles par l'homme, offrent un substrat énergétique intéressant aux bactéries intestinales, et ce notamment sous la forme de chaînes de glucose tels que les fructo-oligosaccharides (FOS) ou gluco-oligosaccharides (GOS). Plusieurs études ont fait état du rétablissement partiel de la richesse grâce à l'utilisation de ces molécules, appelées « prébiotiques », chez l'homme comme chez l'animal.

L'objectif de notre projet est donc qu'une action combinée sur la richesse bactérienne et la réduction de l'inflammation intestinale pourrait améliorer l'état métabolique de l'hôte. A ces fins, nous souhaitons observer l'effet induit par la supplémentation d'animaux soumis à un régime riche en lipides (HFD) en (i) prébiotique dérivé de l'inuline (le FOS), (ii) anti-inflammatoire intestinal comme le 5-ASA, ou (iii) de ces deux composés administrés de manière simultanée. Ainsi, trois groupes de 10 animaux nourris par HFD et traités seront considérés : un groupe recevant le prébiotique, un groupe recevant l'anti-inflammatoire et un groupe recevant une combinaison des deux traitements. Nous considérons également un groupe contrôle de 10 animaux, nourris par HFD mais non traités. Cela représente donc 4 groupes d'étude et un total de 40 animaux qui seront suivis sur une durée de 15 semaines.

Vis à vis de la règle des 3R, ceci correspond au nombre minimal de groupes et de souris nécessaires afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et statistiquement fiables. 10 souris par groupe « traitement » est le nombre minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés (poids, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline). En ce qui concerne le raffinement du protocole, l'ensemble des manipulations effectuées sur les animaux sont de classe légère à modérée. Nous prendrons soin de les faire exécuter par des personnes expérimentées et compétentes afin de réduire la sévérité et l'intensité de la douleur, ainsi que le stress généré au maximum. Nous avons également choisi un matériel et des procédures adéquats pour limiter la douleur et le stress, avec en particulier l'utilisation des sondes de gavage en plastique fines et souples. Un suivi hebdomadaire de prise alimentaire et du poids sera réalisé, ce qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux ainsi que de les habituer aux manipulations et ainsi de générer moins de stress lors des procédures ultérieures (tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline). De plus, un laps de temps de minimum 1 semaines entre les procédures de classe modérée sera respecté afin de laisser un temps de récupération aux animaux. L'utilisation d'autre modèle que l'in-vivo (tel que l'intestin in-vitro) n'est pas adaptée à l'étude des process physiopathologiques (inflammation, insulino-résistance, immunité) liés au diabète de type 2 et de l'obésité.

13172 Les systèmes agroforestiers sont reconnus depuis quelques années dans le cadre de l'atténuation du changement climatique, notamment en climat tropical (accords de Kyoto par exemple). Les travaux menés sur ces systèmes sont considérés comme des options crédibles pour la lutte contre le changement climatique. L'importance de ces systèmes sur le volet adaptation en climat tempéré est par contre moins étudiée.

Sur le terrain, depuis la réforme des réglementations engagée en 2001, le nombre de projets récents progresse et leur surface dépasse les 10 000 ha en 2012. Cette augmentation pose la question de l'accompagnement sur le terrain et soulève surtout de nouvelles questions de recherche, notamment dans une perspective de prise en compte grandissante de l'agroécologie. L'agroforesterie est d'ailleurs citée comme un système de production adapté aux enjeux agro-environnementaux actuels, et devant faire l'objet d'une recherche approfondie.

Pour le secteur de l'élevage, dans un contexte de changement climatique, responsable en partie de la stagnation des rendements agricoles, de périodes de canicules de plus en plus fréquentes, les éleveurs doivent faire face à un contexte économique difficile. Ceci couplé à des sécheresses régulières qui affectent l'autonomie fourragère et plus globalement l'autonomie alimentaire, ces évolutions fragilisent de plus en plus les exploitations.

Dans un futur proche l'allongement des périodes de pâturage est considéré comme l'une des clés d'adaptation des systèmes d'élevage herbivores pour répondre aux évolutions de contexte qu'il soit climatique ou économique. L'allongement de la durée de pâturage, vers des périodes de moindre production fourragère, sur prairies ou sur parcours, permet des économies importantes en fourrages stockés et en concentrés sans dégrader les performances des animaux.

L'implantation d'arbres en prairie peut avoir une influence considérable en modérant la température de l'air et du sol, en accroissant l'humidité relative et d'autre part, en limitant l'évapotranspiration et le stress azoté des cultures. Ces effets bénéfiques à la croissance des cultures sont mis à profit dans de nombreux systèmes d'agroforesterie. Par transposition aux exploitations d'élevage herbivore, l'arbre serait un réel élément de soutien et d'adaptation au changement climatique pour les prairies pâturées par des ruminants mais également en assurant un rôle de protection des animaux vis-à-vis des intempéries ou du soleil durant les périodes hivernales et estivales.

L'expérimentation que nous voulons mettre en place a pour objectif de quantifier l'intérêt de l'arbre dans des prairies pâturées par des ovins. Elle s'étalera sur 6 mois soit toute la période de pâturage et utilisera 30 brebis adultes, sera reconduite trois années consécutives, on utilisera toujours les mêmes brebis, ce qui mobilisera un total 30 animaux sur la durée du projet. Les animaux seront allotés en deux lots de 15 brebis et alloué à l'un des deux traitements suivants : (1) un lot témoin dit nu (une prairie avec un seul arbre isolé de façon à avoir un minimum d'abri pour les animaux), et (2) traitement à densité moyenne (une parcelle avec 60arbres /ha). La taille des parcelles (traitements) est de 0. 8ha pour permettre aux brebis d'y résider 3 à 4 périodes de 3 semaines étalées sur toute la période pâturage (de mai à octobre).

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet et de cette demande, premièrement il n'est pas possible de remplacer l'animal dans cette étude car il n'existe pas de méthode alternative fiable pour valider nos objectifs scientifiques. Deuxièmement les effectifs animaux ont été limités et réduits au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats fiables et en permettant aux animaux d'exprimer des comportements sociaux normaux. Troisièmement, tout est mis en œuvre pour raffiner les procédures expérimentales, en privilégiant des mesures ou procédures peu invasives pour l'animal utilisant notamment des colliers et des capteurs mesurant l'activité en continu des animaux.

Pour limiter le stress et la douleur des animaux durant la réalisation de la procédure, ils feront l'objet d'une couverture antalgique ainsi qu'une anesthésie locale associée à une légère sédation. Pas d'autres dispositions particulières seront prises, si ce n'est que les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour déceler tout changement anormal de comportement (comportement général, apathie, boîterie).

13173 Les maladies neurodégénératives comme l'ataxie spinovérébelleuse de type 7 (SCA7) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

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

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes :

-La maladie d'Alzheimer : la surexpression de l'enzyme clé du métabolisme cérébrale du cholestérol, la cholestérol 24-hydroxylase (CYP46A1), à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles (amyloïde et tau) permet de restaurer les déficits mnésiques.

-La maladie de Huntington : La surexpression de cette même enzyme à l'aide d'un vecteur (de type AAV) permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

L'ataxie SCA7 partage la majeure partie des mécanismes neurotoxiques en jeu dans la maladie de Huntington. Le but de ce projet est donc d'évaluer l'efficacité de cette thérapie génique précédemment validée dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington dans un modèle murin d'ataxie SCA7.

Tous les vecteurs AAV et les préparations utilisées seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages convenus/reconnus. Leur nombre (216) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être efficace dans plusieurs maladies neurodégénératives. Le recours aux modèles animaux est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles.

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

13174 Le rôle de la dopamine est central pour toute une série de fonctions physiologiques majeures, liées au phénomène de plasticité, et qui sont sous-tendues par des cascades de signalisation complexes. La fonction exacte de ces différentes protéines impliquées n'est pas encore très clairement identifiée. Une meilleure compréhension des voies de signalisation de ces protéines et des modifications post-transcriptionnelles qu'elles subissent, suite à la stimulation des récepteurs dopaminergiques, pourrait permettre de mieux comprendre certaines maladies psychiatriques et neurodégénératives qui ont un lien étroit avec le système dopaminergique. Parmi celles-ci, on peut retrouver la maladie de Parkinson et de Huntington, la schizophrénie et la dépendance aux drogues d'abus. Comprendre les phénomènes qui se produisent et qui déstabilisent le bon fonctionnement du système dopaminergique peut, par la suite, permettre l'élaboration d'agents thérapeutiques qui pourront peut-être rétablir l'équilibre de ces voies de signalisation. Pour ce faire, des études *in vivo* utilisant une stimulation dopaminergique intense comme celle produite par la cocaïne (inhibiteur du DAT) permettent d'activer le système dopaminergique dans un cadre physiologique intégré. Une littérature abondante démontre déjà l'intérêt de ce type d'agent pour moduler *in vivo* la voie de signalisation spécifiquement associée à la stimulation des récepteurs dopaminergiques. L'objectif de cette étude est tout d'abord de reproduire ce qui a été montré dans la littérature et d'évaluer s'il est possible de standardiser la procédure afin d'obtenir de données reproductibles et peu variables.

Cette étape consiste à administrer une seule injection de cocaïne (20 mg/kg) par voie intrapéritonéale et puis à sacrifier les rongeurs de l'espèce *Mus musculus* à l'aide d'une irradiation par faisceau de micro-ondes directement dirigés sur la tête des animaux, la mort des animaux est instantanée. Le cerveau sera disséqué afin de collecter certaines structures spécifiques et des protéines d'intérêt, préservées en l'état grâce à la technique de sacrifice, seront analysées (tests biochimiques). Ensuite, une fois cette étape préliminaire terminée, ce test sera utilisé pour tester la capacité des molécules thérapeutiques à contrecarrer l'effet de la cocaïne en rétablissant l'équilibre au niveau des voies de signalisation. Les composés seront donc administrés avant la cocaïne et leur effet pourra être évalué en mesurant leur impact sur un certain nombre de protéines d'intérêt. Pour ce projet, nous utiliserons 216 animaux et considérons la règle des 3R dans le contexte de reproduction des résultats :

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables : nous avons calculé le nombre d'animaux minimum par groupe de façon à obtenir un résultat significatif.

-Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne et une expérimentation réduite à 2 semaines. L'environnement des souris est enrichi via un neslet que les animaux ont à leur disposition pour construire un nid.

-Remplacement : les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences car on étudie la fonctionnalité de molécules suite à la métabolisation par l'organisme du rongeur.

13175 La leucodystrophie métachromatique est une maladie neurodégénérative conduisant à une perte de myéline (isolant de la gaine nerveuse) et une neuro-inflammation conduisant à des symptômes très sévères chez le jeune enfant avec une dégradation très rapide dans les 6 mois suivant les premiers symptômes et un décès des patients dans les 2 ans maximum. Il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement pour les formes symptomatiques de la pathologie pour lesquels nous souhaitons développer une approche.

Le fingolimod est un médicament possédant l'autorisation de mise sur le marché pour la forme rémittente-récurrente de la sclérose en plaques. Ce médicament permet de réduire le nombre de lésion et la neuro-inflammation. Par ailleurs, il a été démontré sur la souris que ce médicament pourrait aider à la restauration de la gaine nerveuse. Par conséquent, ce médicament représente un potentiel thérapeutique dans la leucodystrophie métachromatique. Nous souhaitons évaluer ses effets chez la souris symptomatique (> 6 mois).

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris) car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de cette maladie mais aussi les marqueurs moléculaires et cellulaires. De plus, la souris est un modèle déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire. Si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Notre modèle ne présente, de plus, pas de phénotype dommageable.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis de suggérer les doses de médicament à administrer, la durée d'administration et les temps d'analyses nécessaires. Toutefois, dans un souci d'éthique et de bien-être animal, nous souhaitons tout de même éviter d'avoir recours au gavage pour l'administration de ce médicament. Ainsi, nous souhaitons vérifier la meilleure voie d'administration sur un petit nombre d'animaux avant d'augmenter les effectifs pour réaliser une étude détaillée. Dans ce projet, nous prévoyons un total de 100 souris C57BL/6J et 129 Ola, femelles et mâles, âgées de 6 mois dans la première étude puis de 9 mois dans la seconde. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et les moelles épinières prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

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

13176 La vision, fonction sensorielle essentielle, repose sur des voies visuelles qui transmettent l'information visuelle de l'œil au cerveau. Plusieurs structures du cerveau (la rétine, le noyau géniculé latéral, le colliculus supérieur, le cortex visuel primaire et le système optique accessoire) sont impliquées dans ces voies d'acheminement de l'information visuelle. A l'heure actuelle, un point important qui reste débattu est la quantité d'information parvenant aux neurones de ces structures (convergences, divergences de neurones).

Afin de mieux comprendre comment se passe la connectivité des aires visuelles entre elles (études histologiques) et tester leurs fonctionnalités (études physiologiques), nous allons utiliser dans ce projet des combinaisons de vecteurs viraux porteurs de fluorophores (études histologiques) ou de protéines photosensibles (études physiologiques). Ces vecteurs seront administrés dans les aires visuelles d'intérêt par des injections intraoculaires et intracérébrales.

Ces expérimentations seront menées à la fois chez le rat et la souris. Le rat, car toutes nos études sur lesquelles nous pouvons nous appuyer ont été réalisées sur cette espèce, et la souris car ce modèle permettrait dans l'avenir des études complémentaires sur des lignées transgéniques.

Au total 300 animaux (150 rats et 150 souris) seront nécessaires à ce projet.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; le traçage et la fonctionnalité des aires visuelles dans leur ensemble ne peuvent être réalisés sur des modèles de cellules en culture. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Pour la procédure de chirurgie, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

13177 L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Dans environ un tiers des cas, les patients continuent de présenter des crises fréquentes malgré les traitements antiépileptiques. Il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes thérapeutiques. L'épilepsie du lobe temporal méstral (MTLE) est la forme la plus commune d'épilepsie réfractaire. La plupart des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques du MTLE humain peuvent être reproduites chez la souris par l'injection de kaïnate au niveau de l'hippocampe dorsal (modèle KA). Les souris ont un cerveau assez complexe pouvant générer les activités épileptiques. Le projet constitue un essai sur l'impact de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par l'utilisation ciblée d'ultrasons, méthode non invasive. La perméabilisation de la BHE permet le passage dans le cerveau de médicaments mais également des composants sériques stimulant la neurogénèse (développement du système nerveux.). Notre hypothèse repose sur les bénéfices que pourrait apporter l'induction de cette neurogénèse sur les symptômes épileptiques de notre modèle, et à plus long terme sur le patient. L'utilisation de méthode pouvant enregistrer l'activité cérébrale et des études de structure du cerveau nous permettra de répondre à cette question. Bien que les animaux ne puissent pas être remplacés dans nos expériences, nous prenons les mesures afin de réduire leur utilisation. Nous raffinons sans cesse l'hébergement et utilisation des animaux afin de réduire la douleur, l'angoisse et le stress. L'enrichissement (maisonnettes et neslets) est ajouté pour toutes les cages. Un nombre de 226 (au maximum) souris sera utilisé. L'ensemble du projet est mis en œuvre dans l'application des 3 R : Remplacement, Raffinement, Réduction :

- Remplacement : Le développement au niveau cérébral implique des interactions cellulaires complexes, entre les cellules endothéliales mais également entre les capillaires sanguins et le tissu neuronal, neurones et astrocytes, et les cellules immunitaires. Cette complexité est difficile à

reproduire *in vitro* et nécessite donc l'utilisation d'animaux notamment dans notre cas d'épilepsie focale et le remplacement complet n'est pas possible.

- Raffinement : l'hébergement ainsi que les procédures seront optimisés et dans le but d'améliorer les conditions expérimentales et d'hébergement. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour diminuer la souffrance lors des interventions sur les animaux. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis. A chaque fois qu'il est possible les animaux sont hébergés en groupe dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.
- Réduction : l'ensemble des expérimentations sont effectués de manière à réduire le nombre d'animaux utilisés. La stratégie expérimentale se fait en étape permettant d'appréhender et d'optimiser la taille des lots expérimentaux.

13178 Il existe plusieurs types de tumeurs malignes de l'œil, celle qui est le plus fréquemment rencontrée par les ophtalmologistes spécialisés est le mélanome choroïdien. Cette tumeur se développe sous la rétine dans un tissu appelé choroïde. L'incidence de ce cancer est de 1-2 cas pour 100 000 habitants soit environ 1000 nouveaux cas par an en France. Le principal traitement de cette tumeur maligne intraoculaire est la radiothérapie (utilisation de rayonnements détruisant la tumeur) externe par faisceau de protons (protonthérapie) ou par disque d'iode radioactif placé sur l'œil en regard de la tumeur (curiethérapie). Cette technique permet une rémission de la tumeur oculaire à long terme si la tumeur n'est pas trop épaisse et qu'elle se limite à l'œil ; elle présente le grand avantage de conserver le globe oculaire contrairement au traitement alternatif dans lequel l'œil atteint est enlevé (énucléation). L'amélioration du traitement par radiothérapie est donc un enjeu majeur pour les patients. Cependant, 50 à 60% des yeux traités par radiothérapie oculaire développent une maladie de la rétine appelée rétinopathie radique (liée aux rayonnements) dans les années suivant le traitement. Cette rétinopathie est liée à un défaut de perfusion sanguine de la rétine secondaire à l'altération des capillaires sanguins par les rayons ionisants, conduisant à une perte visuelle irréversible, voire à une énucléation secondaire de l'œil à cause des douleurs engendrées, alors même que la tumeur est contrôlée.

Les principaux traitements utilisés pour limiter les effets secondaires de la radiothérapie ne sont que peu actifs (utilisation du laser, injections intraoculaires, etc) sur l'ischémie rétinienne.

L'enjeu du projet est de comprendre comment s'installent les complications vasculaires dans la rétine saine qui surviennent après la radiothérapie, afin de mieux les cibler avec un traitement adapté, et éviter d'en arriver à devoir enlever l'œil.

Certains mécanismes des rayonnements menant aux complications vasculaires sont connus (dégradation directe ou indirecte de l'ADN, pertes des cellules endothéliales (qui tapissent les capillaires rétinien et évitent les caillots)) mais ils ne peuvent pas expliquer toutes les modifications observées.

Nous voulons tester ici une hypothèse prometteuse : l'inactivation d'une succession de signaux cellulaires, déclenchée par les radiations ionisantes et qui serait en partie responsable des complications de la rétinopathie radique. Ceci serait possible grâce à un médicament qui existe déjà (Fasudil), et qui permettrait de prévenir la rétinopathie radique. A ce stade, une phase de recherche préclinique (chez l'animal) est indispensable pour tester ce traitement par voie intraoculaire (les traitements par prise orale ou intraveineuse n'ont qu'une très faible diffusion dans l'œil).

Les expériences qui pouvaient être faites sur des lignées cellulaires *in vitro* ont déjà été réalisées et il est maintenant nécessaire de passer au vivant pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

Les objectifs de l'étude sont :

- Comprendre les effets secondaires à une irradiation oculaire thérapeutique dans un modèle animal de rétinopathie radique chez le rat Long Evans et GK.
- Étudier, dans le même modèle, l'effet de l'administration intraoculaire d'un nouveau traitement sur la rétinopathie radique.

L'espèce utilisée est le rat, souche Long Evans (dont la pigmentation permet une bonne visualisation du fond d'œil en imagerie oculaire) et GK (pour lesquels les anomalies vasculaires rétiniennes apparaîtront plus tôt).

Conformité à la règle des 3R :

Remplacer : Des études *in vitro* ont déjà été réalisées sur des lignées cellulaires irradiées mais ne permettent pas la compréhension des mécanismes retardés liés à l'irradiation.

Réduire : Le nombre total d'animaux nécessaires est de 594 animaux. Ce nombre a pu être réduit de moitié par la division des rétines de rat en deux demi-rétines permettant de doubler le nombre d'échantillons. Les analyses statistiques pour les différents marqueurs étudiés nécessitent un nombre d'échantillons minimal de 5 demi-rétines pour avoir des données significatives. La phase exploratoire permettra de sélectionner les marquages et analyses les plus pertinents pour diminuer au maximum le nombre d'animaux.

Raffiner : Tous les examens et interventions sur les animaux se feront sous anesthésie générale et locale limitant ainsi tout stress ou douleur causés aux animaux. De plus, les interventions réalisées sont pratiquées chez l'homme soit sous anesthésie locale (Injection intraoculaire) soit sans anesthésie (radiothérapie, imagerie oculaire) et sans douleur majeure. Les animaux sont hébergés en conditions enrichies (tunnels en carton) avec respect du rythme circadien sous surveillance quotidienne. Pour éviter une cécité chez les rats, seul un œil par rat recevra les rayons ionisants.

En conclusion cette étape expérimentale est indispensable pour avancer dans la compréhension de la rétinopathie radique et le développement d'un médicament à utiliser en prévention de cette maladie. Une banque de partage d'organes de rongeurs est en voie de création dans l'institution.

13179 Chaque année, un carcinome hépatocellulaire est diagnostiqué chez plus d'un demi-million de personnes dans le monde. Les facteurs de risque associés au CHC comprennent les infections chroniques (hépatite B et C), la stéatose hépatique (accumulation de graisses dans le foie) alcoolique ou non alcoolique. Le carcinome hépatocellulaire est l'une des tumeurs malignes les plus meurtrières au monde. Il se caractérise par son autosuffisance, son insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, son évitement de l'apoptose, son potentiel de réplication illimité, son angiogenèse prolongée, son évasion tissulaire et ses métastases. Plusieurs modalités de traitement sont disponibles. Toutefois, seules les résections chirurgicales et les greffes de foie sont considérées comme curatives si elles sont diagnostiquées à un stade précoce. Étant donné que la majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé, seuls 15% des patients sont éligibles pour des traitements curatifs et ils ont généralement un pronostic sombre avec des durées de survie médianes inférieures à 1 an. En 2007, le Sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase (TKI), a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour une utilisation dans le traitement du carcinome hépatique avancé. Cependant, l'efficacité globale du traitement ciblé par Sorafenib reste modérée (prolongation de trois mois de la durée de survie). À terme, de nouvelles stratégies thérapeutiques représentent donc un enjeu majeur de santé publique. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de l'hépatocarcinome. L'évaluation de l'efficacité de nos molécules sera réalisée dans un modèle de rongeurs développant cette pathologie induite par un régime alimentaire enrichi en sucres et en graisses associé à l'injection d'un agent chimique. Le modèle décrit dans ce projet s'appuie sur une étude de la littérature scientifique. Il s'agit de mettre en évidence les propriétés préventives voire curatives de nos molécules.

De nombreux modèles utilisant les rongeurs ont été décrits dans la littérature pour l'étude de cette pathologie. Cependant aucun ne reproduit parfaitement la physiopathologie humaine.

Ainsi, nous souhaitons développer un modèle innovant et de le caractériser sur le développement de l'hépatocarcinome, et à terme évaluer les capacités thérapeutiques de nos molécules.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de l'hépatocarcinome sera réalisée au cours des 5 années couverte par ce projet avec 5180 souris.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaire et cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer

partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3R. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux restent cependant nécessaires. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal entier permet d'évaluer l'efficacité réelle des composés dans un système biologique complexe et « global ». L'hépatocarcinome est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle de réduction, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. Les procédures réalisées sur les animaux dans ce projet sont d'une gravité modérée, cependant au stade avancé de la pathologie (HCC), une prise en charge éventuelle de la douleur sera mise à place le cas échéant par administration de buprénorphine dans l'eau de boisson.

Les points limites sont décrits en 3. 4. 13, une surveillance accrue sera pratiquée dans le cas où une dégradation de l'état général des animaux est constatée.

De plus, en respect de la règle de raffinement, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

Bien que l'hépatocarcinome est le plus souvent découvert fortuitement chez l'homme car asymptomatique dans ses premières phases de développement, une prise en charge de la douleur sera mise en place dans notre modèle le cas échéant.

13180 Le paludisme reste encore à l'heure actuelle un problème de santé publique majeur. L'apparition de résistances aux traitements thérapeutiques et l'absence de vaccin efficace motivent l'intérêt que nous portons à la biologie du parasite responsable : le Plasmodium. Dans ce contexte, nous visons à caractériser, tant au niveau moléculaire que fonctionnel, des protéines essentielles pour le parasite.

La plus grande partie de nos expériences fait appel à des techniques de biologie moléculaire et de biochimie. Nous validons ensuite nos résultats sur le parasite dont nous maintenons en culture le cycle érythrocytaire. Les animaux (souris) sont utilisés en deuxième approche (remplacement) dans le but soit de générer des parasites génétiquement modifiés en cas d'échec *in vitro*, soit de tester *in vivo* des composés à potentiel thérapeutique pour lesquels des tests sur le parasite *in vitro* auront fourni des résultats prometteurs en termes d'index thérapeutique (rapport activité anti-paludique/toxicité). Ces étapes préalables *in vitro* nous permettent de présélectionner les gènes/composés d'intérêt et donc de réduire le nombre d'animaux à utiliser.

Raffinement : Les souris infectées font l'objet d'un contrôle régulier par des personnes ayant une grande expérience dans le suivi de l'infection expérimentale de rongeurs par Plasmodium. Ce contrôle vise non seulement à suivre l'évolution de l'infection, mais également à apprécier l'apparition d'éventuels signes de souffrance. Ceux-ci peuvent ainsi être pris en compte au plus tôt.

Dans ce projet, le nombre total maximum souris utilisées sur la période sera de 6924 souris.

13181 Les inflammations chroniques des voies respiratoires profondes sont fréquentes chez les chevaux et constituent, en dehors de tout contexte infectieux, la cause principale de toux chez le cheval associé à des baisses de performance.

Les chevaux sont un modèle d'étude de la maladie humaine car de grandes similitudes existent entre l'asthme humain et l'asthme équin, et la maladie est également spontanée chez les Equidés. L'asthme se caractérise par un bronchospasme réversible, avec des alternances de crises (allant parfois jusqu'à la détresse respiratoire aiguë) et des périodes de rémission.

L'origine est multi-factorielle, avec implications d'allergènes que sont les micro-moisissures du fourrage, mais aussi d'agents environnementaux irritants (micro-poussières, endotoxines etc...).

L'asthme chronique aboutit à des modifications tissulaires bronchiques irréversibles.

La prise en charge thérapeutique consiste au moment des crises à administrer des corticoïdes et des bronchodilatateurs. Ceux-ci ne sont pas exempts d'effets secondaires et ne peuvent être donnés en permanence. De plus, les chevaux doivent être soustraits à la compétition pendant une longue période post-traitement.

La gestion environnementale du cheval pour diminuer l'exposition aux micro-moisissures et aux poussières fait partie du traitement, mais n'est pas toujours simple à mettre en œuvre par les propriétaires.

Les cellules du système immunitaire jouent un rôle primordial dans le développement et le maintien de l'asthme. Un déséquilibre de production ou d'action de cytokines libérées par les leucocytes pulmonaires pourrait contribuer au développement / maintien de la maladie.

De nouvelles stratégies thérapeutiques ont vu le jour en médecine humaine et vétérinaire et l'utilisation d'agents biologiques modifiant l'expression des cytokines par les cellules immunitaires, soit à effet immunomodulateur, sont largement utilisés dans le traitement de maladies auto-immunes, cancers, et affections inflammatoires chroniques.

L'objectif de cette étude est de vérifier l'innocuité ainsi que l'efficacité sur la prise en charge de l'inflammation bronchique des chevaux asthmatiques, grâce à l'administration de plasma autologue stimulé pour produire des cytokines immunomodulatrices ou par l'administration de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) néonatales hétérologues.

Application des 3 R

Remplacer :

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant les conditions physiologiques nécessaires à l'évaluation clinique. De plus, les phases de développement clinique sur l'animal cible sont nécessaires pour l'évaluation réglementaire d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché

Réduire :

Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux pour chaque groupe afin d'obtenir des données fiables et analysables. 12 chevaux sont prévus : 6 chevaux sains permettant de tester l'innocuité des produits biologiques ainsi que 6 chevaux asthmatiques pour l'obtention des données d'efficacité préliminaire. Les procédures sont peu invasives et nous permettent d'utiliser la même cohorte d'animaux pour tester les deux thérapies en incluant une période de quelques mois entre les 2 procédures.

Raffiner :

Ce modèle étant non invasif, nous n'attendons pas que notre protocole provoque de signes cliniques majeurs chez les Chevaux. Notre établissement est adossé à un centre hospitalier vétérinaire spécialisé dans le soin aux chevaux et en cas de signes cliniques anormaux, voire d'urgence respiratoire, le cheval serait pris en charge immédiatement pour être soigné. Nous n'attendons pas non plus de douleur induite par le protocole, mais si elle devait apparaître, elle serait immédiatement prise en charge. Toutes les procédures d'administrations, d'examens ou de prélèvements seront réalisées selon les procédures vétérinaires de l'établissement afin d'éviter toute souffrance animale. Les animaux seront acclimatés à l'environnement, au personnel, seront hébergés en groupe dans des paddocks comportant des abris. Les chevaux sont, pour certains, réutilisés d'autres projets et, pour la majorité placée chez des particuliers après ces travaux de recherche.

13182 Le projet a pour objectif d'évaluer les qualités gustatives et nutritionnelles d'aliments développés et destinés aux chats et aux chiens, avant leur commercialisation. Ces études visent à élaborer des recettes d'aliments qui répondent aux besoins nutritionnels des chats et des chiens à tous les stades de leur vie. Au cours de ce projet de 5 ans, 559 chats et 231 chiens seront nécessaires pour évaluer les bénéfices nutritionnels apportés par ces nouvelles recettes, selon les mêmes procédures. Les principaux paramètres analysés sont : la prise alimentaire, le niveau de digestibilité des aliments, la

consistance des selles, et le pH urinaire. Dans le cadre de ce projet, les animaux seront principalement hébergés en groupe socialement équilibré. Certains d'entre eux seront hébergés individuellement pendant une courte période afin de collecter des échantillons de selles et d'urine. Dans le cadre de l'application des 3R, les mesures suivantes ont été prises : 1) Réduire la période d'hébergement individuel au minimum pour assurer une collecte suffisante d'échantillons de selles et d'urine ; 2) Héberger les animaux dans des locaux dont la surface est supérieure aux exigences réglementaires en vigueur pour les espèces concernées, et favorisant le contact visuel, olfactif et auditif avec d'autres congénères, ainsi qu'un accès à des espaces extérieurs ; 3) Réduire le nombre d'animaux par groupe d'étude au minimum recommandé dans la littérature, ou d'après des données d'analyses statistiques internes tenant compte des défécations potentielles en cours d'étude ; 4) Mettre en place un programme d'activités et de socialisation quotidiennes et variées (jeu, toilettage, promenade, sorties en parc) contribuant au bien-être individuel des chats et des chiens ; 5) et finalement développer un programme actif de placement pour tous les animaux afin qu'ils puissent intégrer une famille d'adoption, lorsqu'ils ne participent plus aux études ci-dessus mentionnées.

Compte tenu de la question scientifique de ce projet, le remplacement du modèle animal n'est pas possible.

13183 L'OMS estime à 422 millions le nombre de personnes souffrant du diabète dans le monde en 2014 et prévoit qu'il sera en 2030 la 7e cause de décès. En France, le nombre de personnes atteintes du diabète s'élève à plus de 5 millions.

Le diabète se caractérise par une hyperglycémie chronique. Chez les patients atteints de diabète de type 1, les cellules bêta du pancréas, regroupées en amas appelés îlots de Langerhans, sont détruites et de ce fait le corps ne fabrique plus d'insuline, l'hormone permettant la régulation du taux sanguin de sucre. L'unique traitement proposé aux patients est alors l'apport régulier d'insuline afin de normaliser le taux de glucose sanguin qui est trop élevé. La mesure du glucose sanguin de façon régulière et fiable est donc indispensable pour permettre un traitement adapté des patients diabétiques par injection automatisée d'insuline en quantité adéquate.

Dans ce contexte, les recherches portant sur le développement de nouveaux dispositifs de mesures de la glycémie en continu fournissant une valeur robuste, sur laquelle un choix thérapeutique peut être pris, sont très importants pour améliorer la qualité de vie des patients diabétiques de type 1 en alternative aux mesures itératives actuellement réalisées sur gouttes de sang. L'électrode de mesure sous cutanée couramment utilisée de nos jours a une durée de vie limitée à quelques jours, et son insertion sous la peau est douloureuse. Pour limiter cette contrainte quotidienne pour les patients diabétiques, le présent projet propose de tester un nouveau mode de mesure utilisant un dispositif optique non invasif placé à la surface de la peau et mesurant la glycémie : les performances de ce dispositif innovant seront évaluées sur un modèle porcin.

Remplacement :

Préalablement à cette étude, le dispositif a été mis au point et testé sur un banc expérimental *ex vivo*. Avant de proposer une étude clinique, il est ensuite apparu nécessaire de confirmer *in vivo* sa fiabilité pour la détermination des taux de glucose sanguin, aussi bien pour des valeurs de glycémie "normales", qu'en cas d'hypo- ou d'hyperglycémie extrêmes. Pour des raisons de sécurité, les premières mesures effectuées à ce jour en laboratoire n'ont pu être réalisées que pour des valeurs de glycémie "normales" chez des patients sains et elles se sont révélées fiables en comparaison avec des techniques classiques de mesure de la glycémie. Il convient maintenant de valider le bon fonctionnement du dispositif dans les futures conditions d'utilisation chez les patients diabétiques, susceptibles de présenter de très faibles et de très forts taux de glucose dans le sang. Préalablement à la poursuite d'une étude clinique, il est donc nécessaire de tester la capacité de détection fiable par le nouveau dispositif des valeurs de glycémie extrêmes sur un modèle de porc sain, voire de porcs rendus diabétiques et donc incapables de réguler physiologiquement leur glycémie pour la contenir dans des valeurs moyennes.

Réduction :

Le modèle choisi est le cochon (pour sa peau dont les caractéristiques sont proches de celles de l'Homme, ainsi que pour ses similarités métaboliques), rendu ou non diabétique par injection de streptozotocine. La mise en œuvre de ce modèle de porcs diabétiques étant délicate, les mesures de glycémie seront réalisées avec le dispositif à tester dès que leur état métabolique permettra de faire varier leur glycémie entre les valeurs extrêmes requises. Le projet visant uniquement à vérifier *in vivo* la fiabilité du nouveau dispositif, un nombre limité de tests concluants sera suffisant pour répondre à l'objectif scientifique fixé qui sera poursuivi ensuite chez l'Homme. Une évaluation du besoin sera réalisée après mise en expérimentation de chaque animal afin d'arrêter les études dès que les résultats nécessaires seront obtenus, de façon à limiter le nombre total d'animaux utilisés. Pour répondre à notre besoin, le nombre maximal de porcs nécessaires sera de 10.

Raffinement :

Pour garantir le bien-être des porcs, ils seront hébergés dans des installations adaptées à leurs besoins spécifiques, dans un environnement social enrichi. Un conditionnement préalable aux manipulations sera effectué afin de limiter le stress lié à leur contention et aux manipulations requises pour les prises de sang nécessaires à l'évaluation de la glycémie. Le mode de mesure de glycémie à évaluer est indolore pour l'animal, mais néanmoins, au cas où le conditionnement préalable s'avérerait insuffisant pour garantir son bien-être, nous aurions recours à une anesthésie générale pour limiter le stress de l'animal. De plus, en cas de mise en œuvre du modèle pathologique, la surveillance des animaux rendus diabétiques sera effectuée plusieurs fois par jour, ainsi que la mesure de leur glycémie, afin de pouvoir la réguler via des injections d'insuline ou des apports de glucose adaptés aux besoins des animaux diabétiques, assurant ainsi leur bien-être tout au long du programme expérimental qui durera au maximum un mois à partir du moment où l'animal sera rendu diabétique.

13184 Avant la 1^{ère} administration de candidats-médicaments à l'Homme, des études de pharmacologie de sécurité chez l'animal sont requises par différentes directives internationales (ICH S7A et S7B et ICH M3/R2, OCDE) afin de permettre d'en évaluer les effets secondaires sur les grandes fonctions vitales (cardiovasculaire, respiratoire et système nerveux central). Les résultats de ces études sont essentiels pour assurer la sécurité des patients dans les essais cliniques. Les études réglementaires doivent être conduites en respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) qui garantissent leur qualité et intégrité. Ces dernières font l'objet d'inspections spécifiques et sont destinées à être soumises à différentes autorités réglementaires à diverses étapes du développement des candidats-médicaments.

Ce projet couvre les études réglementaires de pharmacologie de sécurité réalisées chez le chien ainsi que les études de pharmacologie préliminaires ou investigatrices qui sont y associées ou découlent d'observations toxicologiques. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 310 sur une période de 5 ans.

L'objectif de cette autorisation de projet est de définir les procédures opératoires mises en œuvre afin d'évaluer les effets de différents candidats-médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires et/ou respiratoires chez le chien vigile en utilisant la télémétrie (mesure à distance de différents paramètres physiologiques chez l'animal vigile non contraint). Au cours de ces études, les chiens, une fois instrumentés, recevront un ou plusieurs candidats-médicaments testés à plusieurs doses (généralement 3) et/ou un produit de référence. Cette autorisation de projet couvre également la phase de mise en place du modèle chirurgical et de la technique de télémétrie associée nécessaires à la mise en œuvre du projet lui-même.

La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales afin d'obtenir les résultats les plus fiables et scientifiquement pertinents tout en garantissant les plus hauts standards en matière de qualité, de bien-être animal et d'éthique (remplacement, réduction, et raffinement). A ce titre, celles-ci requièrent, en général, des chiens des 2 sexes, dont l'âge et poids peuvent varier. Le nombre minimal d'animaux est dicté par les lignes directrices réglementaires internationales (OCDE

notamment) et la durée de l'étude varie de 1 semaine à 4 mois, avec éventuellement une période de récupération.

Au cours des études, les animaux reçoivent, en général, par voie orale les candidats-médicaments, sont soumis à des examens cliniques et des paramètres biologiques sont mesurés et un examen post mortem peut être conduit dans des cas particuliers.

Pour les études « non réglementaires » préliminaires ou d'investigation, les critères ci-dessus peuvent être modulés (e. g. nombre de chiens inférieur) dans la mesure où les objectifs diffèrent.

Une attention particulière est apportée aux exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement de la conception jusqu'à la fin des études. L'utilisation du modèle *in vivo* est indispensable et le nombre d'animaux a été réduit au maximum. Les chiens seront hébergés en groupe sauf si les objectifs scientifiques nécessitent un hébergement individuel, dans ce cas, la période sera réduite au strict minimum pour atteindre les objectifs de l'étude, les animaux seront ensuite hébergés en groupe. Afin de promouvoir le bien-être des animaux, ces derniers seront hébergés dans des boxes contenant des éléments d'enrichissement de l'environnement (jouets, planches de repos), seront en contact avec le personnel, seront surveillés cliniquement par les techniciens et/ou vétérinaire, recevront des récompenses alimentaires après les actes techniques et seront habitués à certaines manipulations grâce à la méthode du clicker training.

13185 La plupart des vaccins efficaces reposent sur la formation d'une mémoire immunitaire basée sur les lymphocytes B et les anticorps protecteurs qu'ils fournissent.

De façon surprenante, la vaccination est un processus essentiellement empirique et les paramètres qui conditionnent une réponse efficace lors d'un rappel vaccinal sont très mal connus. Nous souhaitons donc étudier l'impact du calendrier de vaccination (délai entre l'immunisation et le rappel), de l'impact de différents adjuvants et de la nature des antigènes utilisés (pathogènes entiers inactivés vs. Protéines purifiées) sur la réponse des cellules mémoires B lors d'un rappel vaccinal.

Ce projet, qui vise à mieux comprendre les conditions de l'efficacité des vaccins, impliquera des injections d'antigènes (intrapéritonéales, sous-cutanées ou intramusculaires), le sacrifice des animaux à différents temps après immunisation (euthanasie par CO₂) et le prélèvement d'organes lymphoïdes pour analyse de la réponse. 500 animaux seront utilisés pour former les différentes cohortes.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au nombre minimum requis pour la validation statistique des résultats. Le modèle *in vivo* ne peut être remplacé. Les procédures n'induisent pas de pathologies spécifiques à long terme, au-delà du geste de vaccination. On utilisera une anesthésie et un analgésique pour les immunisations localement douloureuses (intra-musculaires) et une surveillance sera effectuée dans les 2 jours suivant la vaccination. La surveillance des animaux sera donc effectuée dans le contexte des pathologies spontanément occurrence dans un hébergement de rongeurs, et la mise à mort anticipée en cas de signes cliniques de souffrance sera effectuée.

A terme, ce projet doit permettre de mieux définir les conditions d'une réponse immunitaire persistante, efficace et capable de s'adapter à la diversité des infections.

13186 En raison de sa sévérité, de sa résistance aux traitements antalgiques classiques, et de ses conséquences sur la qualité de vie des patients, la douleur chronique d'origine inflammatoire ou/et neuropathique représente un véritable défi clinique. En effet, la douleur chronique, qui est caractérisée par un abaissement du seuil nociceptif, s'accompagne souvent du développement de troubles de l'humeur, du sommeil et de perturbations des processus attentionnels et exécutifs. Le présent projet a pour objectif d'évaluer les troubles somatosensoriels (Douleur), affectifs (Anxiété, dépression), végétatifs (Cycle veille-sommeil) et cognitifs (Attention, vigilance, impulsivité, prise de décision, motivation) dans un modèle murin de douleur neuropathique par constriction de la branche principale du nerf sciatique (« Cuff ») et dans un modèle de douleur inflammatoire mimant la monoarthrite par administration d'adjuvant complet de Freund au niveau de la patte postérieure (coussinet de la voute plantaire). Une combinaison d'approches complémentaires,

comportementale, électrophysiologique, pharmacogénétique, biochimique et immunohistochimique sera mise en œuvre, dans le respect du principe des « 3R ». En particulier, nous veillerons à réduire au maximum les contraintes expérimentales pour limiter toute souffrance inutile ou excessive, à remplacer les animaux, si possible, et à raffiner nos procédures pour une utilisation du nombre minimum de souris nécessaires avec un maximum de 9280 sur 5 ans. Les mesures appropriées pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie, points limites adaptés...) seront mises en place en veillant à ne pas interférer avec les processus douloureux étudiés. Les résultats escomptés permettront de mieux comprendre d'une part les relations entre douleur chronique, dépression et cognition et d'en préciser les mécanismes neurobiologiques, et d'autre part d'identifier de nouveaux marqueurs diagnostiques ou pronostiques potentiels et d'évaluer l'efficacité de stratégies thérapeutiques innovantes telles que les techniques de stimulation cérébrale non invasives (Stimulation transcrânienne par courant continu ou tDCS « Transcranial Direct Current Stimulation » ; stimulation du nerf vague ou VNS, Vagal Nerve Stimulation) ou certains immunomodulateurs (SuperMapo). A plus long terme, ce projet pourrait ainsi contribuer à améliorer la qualité de vie des patients, voire permettre une meilleure prise en charge curative ou / et préventive.

13187 La thrombose est un enjeu majeur de santé publique dans les pays européens avec plus de 3 millions de décès par an, bien devant les cancers. Des études scientifiques récentes de la littérature ont permis d'identifier un nouveau partenaire dans le développement de la thrombose : les NETs pour Neutrophile Extracellular Trap. Ces NETs sont des filaments d'ADN (acide désoxyribonucléique) décondensés qui sont littéralement expulsés du neutrophile. Ces filaments sont en contact avec le compartiment sanguin comme les plaquettes et l'endothélium qui constitue la face interne du vaisseau. Nous souhaitons étudier les interactions des cellules endothéliales et des plaquettes avec les NETs au cours du développement de la thrombose.

Pour cela nous utiliserons trois modèles de thrombose différents mimant différents types de thromboses : la thrombose veineuse profonde (DVT), l'immuno-thrombose (sans lésion de la paroi endothéliale, modèle par blessure au rayon laser) et thrombose avec lésion de la paroi endothéliale (Chlorure de fer). Nous estimons que ce projet nécessite 554 souris C57/Bl6 et 548 souris dont l'ADN des neutrophiles est visualisable grâce à la GFP. L'ensemble de ce projet tient compte de la règle des 3R (Remplacer, Raffiner, Réduire).

L'utilisation d'animaux est indispensable pour ce projet, aucune technique *in vitro* n'est à ce jour capable de reproduire un vaisseau sanguin, notamment sa réactivité aux stimulus et sa contractibilité (Remplacer). De plus l'utilisation d'animaux nous permet d'évaluer plusieurs cellules (cellules endothéliales, neutrophiles, et plaquettes) dans leur milieu natif, en flux, sans ajout d'anticoagulant ou antiplaquettaire.

Les animaux sont hébergés en groupe de 5 maximum avec un accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson sous cycle circadien et en présence d'enrichissement pour nidification (Raffiner). Les expériences de thromboses veineuses profondes (DVT) sont de classe modérée et sont effectuées sous anesthésie volatile complétée par un analgésique. Les animaux sont gardés sous surveillance jusqu'à leur réveil complet, puis euthanasiés au plus tard 48H après le début de la thrombose. Au cours de ces 48 heures aucune souffrance n'est attendue, cependant si une souffrance est détectée nous administrerons un analgésique (Raffiner).

Les expériences d'immuno-thrombose et de lésion endothéliale sont de classe sans réveil, les animaux sont maintenus sous anesthésie profonde durant toute l'expérimentation puis euthanasiés par un excès d'anesthésique (Raffiner).

Dans un souci d'utilisation d'un nombre minimal d'animaux, le nombre total d'animaux annoncé (1102) a été calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques. Cependant, si une différence significative est obtenue entre des groupes expérimentaux avant l'utilisation du nombre total d'animaux par lots, la totalité des animaux annoncés ne sera pas utilisée. Dans la mesure du possible plusieurs tests seront pratiqués à partir des mêmes animaux comme l'isolement des neutrophiles et des plaquettes (Réduire).

13188 L'arrêt cardiaque représente une affection majeure de santé publique avec environ 40 000 cas chaque année en France. Cette affection est associée à un très faible taux de survie puisque la majeure partie des patients réanimés meure dans les quelques jours qui suivent l'arrêt cardiaque d'une sévère dysfonction neurologique. L'une des principales hypothèses physiopathologiques pour expliquer cette atteinte cérébrale est l'existence d'altérations métaboliques sévères survenant lors de l'ischémie et la reperfusion, comme démontrées dans de nombreuses études portant sur l'accident vasculaire cérébral ou le traumatisme crânien.

Au cours de cette étude, nous nous proposons donc d'évaluer le rôle des altérations métaboliques cérébrales dans la physiopathologie de l'arrêt cardiaque expérimental.

Dans un premier temps, l'objectif sera de caractériser les altérations du métabolisme cérébrale au décours de l'arrêt cardiaque par dosage. Dans un second temps, l'objectif sera d'évaluer les effets de l'administration de pyruvate ou de lactate (deux molécules centrales dans le métabolisme cérébral) sur la récupération neurologique. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle d'arrêt cardiaque chez le lapin anesthésié que nous réanimons à l'aide d'un massage cardiaque et d'adrénaline intraveineuse. Les animaux recevront ensuite l'administration de pyruvate ou de lactate par voie intraveineuse. Les animaux seront ensuite réveillés, maintenus dans des conditions adéquates d'analgésie, et recevront une évaluation quotidienne de la fonction neurologique à l'état éveillé pendant 72h.

Compte tenu de la complexité de l'affection considérée et du caractère diverse des critères étudiés ici, cette situation ne peut pas être mimée *in vitro* et il n'existe aucune méthode alternative (absence de Remplacement possible). Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux minimum pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). Chaque expérience sera valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires (Raffinement). A toute les étapes susceptibles d'être à l'origine d'une douleur, les animaux feront l'objet d'une anesthésie ou d'une analgésie avec des antalgiques puissants (Raffinement). Nous utiliserons ainsi 120 lapins sur une période de 3 ans. Les conditions d'hébergement des animaux correspondent aux normes en vigueur.

13189 Plus de la moitié des patients souffrant d'un cancer reçoivent un traitement par chimiothérapie. Cependant certaines tumeurs cérébrales, dont les glioblastomes, récidivent principalement suite à une faible réponse des cellules tumorales à la thérapie. Identifier les voies moléculaires régissant ces mécanismes de résistance permettra de synthétiser des inhibiteurs de ces voies utilisables en clinique humaine pour accroître l'efficacité de la thérapie.

Nous avons identifié dans des cellules de glioblastomes cultivées *in vitro* la protéine Rad18 impliquée dans les mécanismes de résistance de ces cellules. Nous avons fait la preuve de concept *in vitro* que, le blocage de cette voie biologique permettrait de rendre la thérapie plus efficace.

Chez le patient, les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement vascularisé, contenant d'autres types cellulaires, au contact duquel elles se modifient, s'adaptent, diffusent. Il est donc indispensable de valider notre preuve de concept dans ce contexte plus global, impossible de reproduire *in vitro*. Nous envisageons donc d'utiliser le modèle murin Rad18 déficient, dans lequel seront générés des glioblastomes afin de valider *in vivo* les études *in vitro*. Après traitement thérapeutique de la tumeur, nous nous attendons à observer une diminution ou un blocage de la croissance tumorale beaucoup plus important dans les tumeurs qui seront invalidées pour la cible d'intérêt. Ces essais pré-cliniques conduiront à la réalisation d'essais cliniques associant des inhibiteurs de cette voie à la radiothérapie chez les patients porteurs de glioblastome.

Ce projet sera réalisé sur 1 an, soit un nombre total de 60 souris au maximum, afin de comprendre le rôle de la protéine Rad18 dans la résistance thérapeutique, de valider la cible identifiée et d'obtenir des valeurs d'efficacité statistiques permettant un développement clinique ultérieur.

La règle des 3R sera appliqué selon les modalités suivantes

-Remplacement : la nécessité d'un microenvironnement vascularisé n'autorise que des études sur l'animal, ceci dit le projet est basé sur des expérimentation *in vitro* validant le passage et la faisabilité chez la souris.

Réduction : Sur la base de nos études antérieures et des données de la littérature, nous avons limité le nombre d'animaux par groupe de traitement pour avoir une significativité statistique ce qui évitera de renouveler plusieurs fois les mêmes expériences. De plus, nous utilisons sans distinction mâles et femelles optimisant l'utilisation des animaux produits.

Raffinement : l'hébergement, l'enrichissement et la manipulation des animaux répondent à la réglementation pour le bien-être des animaux. Pour les protocoles expérimentaux, une méthode non-invasive d'évaluation de la tumeur est utilisée ; lorsque cela est nécessaire, l'animal est manipulé sous anesthésie (induction des tumeurs et traitement thérapeutique des animaux). Une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites spécifiques du protocole est mis en place pour assurer une prise en charge adaptée de l'animale en expérimentation.

13190 Les Leucémies Aigues Myéloïdes (LAM) sont les leucémies les plus fréquentes de l'adulte. Leur traitement à très peu changé au cours des 40 dernières années. Il est, en effet, basé sur une chimiothérapie intensive. Les rechutes sont cependant très fréquentes et le pronostic global très sombre. Les travaux de notre équipe ont pour but de trouver de nouvelles cibles thérapeutique pour améliorer la prise en charge de LAM, notamment après rechute. Nos travaux précédents ont permis d'identifier des cibles potentielles qui ont été validées *in vitro*, sur des lignées cellulaires (sensibles ou résistantes aux chimiothérapies) et sur des cellules de patients. Afin de valider la pertinence thérapeutique de nos travaux, et en vue d'une utilisation clinique future, il est maintenant indispensable de les valider dans des modèles pré-cliniques de LAM. Nous utiliserons deux modèles murins largement utilisés pour l'étude des LAM. Le premier consistera à injecter en intra-veineux des lignées de LAM (chimio-sensibles ou -résistantes, modifiées génétiquement pour moduler les voies étudiées) dans des souris immunodéprimées qui seront ensuite traitées ou non avec des agents chimiothérapeutiques et/ou des inhibiteurs pharmacologiques des voies étudiées. Le deuxième modèle consistera à injecter des cellules de patients dans des souris NSG (Nod-Scid-IL2gR). Après prise de greffe, les souris seront traitées avec des molécules ciblant les enzymes étudiées et leur effet anti-leucémique sera analysé. Afin d'appliquer la règle des 3R, nous utiliserons principalement des lignées bio-luminescentes (exprimant la luciférase) et le développement tumoral sera suivi sans euthanasie des animaux grâce à une caméra spécifique, ce qui permettra de fortement limiter le nombre d'animaux utilisés et de diminuer les procédures invasives (réduction). Les souris seront anesthésiées pour les procédures invasives et euthanasiées dès qu'elles atteindront les points limites définis pour chaque protocole (raffinement). Chaque fois que cela est possible, les expériences seront effectuées *in vitro* sur des cellules en culture (remplacement). Le nombre d'animaux maximal qui sera utilisé sur la durée du projet (5 ans) est de 2230 souris.

13191 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie autoimmune caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigés contre l'organisme) associée à une inflammation pouvant toucher différents organes. Les souris MRL/lpr développent une maladie très proche du lupus érythémateux disséminé humain. L'objet de nos études est d'identifier des molécules (peptides ou petites molécules chimiques) capables d'influencer, de manière bénéfique, le cours de la maladie. Ces molécules sont générées sur la base de cibles que nous caractérisons au travers d'études moléculaires et cellulaires chez l'homme et/ou la souris. C'est ainsi que le potentiel d'un peptide a été évalué et est aujourd'hui en essai clinique avancé chez les patients lupiques. Ce travail nous a permis de valider le modèle murin utilisé (souris femelles MRL/lpr de 6 à 8 semaines) et le protocole utilisé car c'est par les études que nous avons réalisées chez ces souris, dans le protocole indiqué, que ce peptide a pu être caractérisé pour son intérêt thérapeutique. Nous poursuivons donc cette démarche, soit en testant de nouvelles molécules pour des indications précises de la maladie, soit en évaluant des analogues de la molécule déjà en essai. Nous testons également des molécules anti-inflammatoires mises au point par nos partenaires. Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une maladie autoimmune chronique causée par l'insuffisance de production des sécrétions de certaines glandes, notamment les glandes salivaires et lacrymales. L'apparition de cette pathologie peut être secondaire à un lupus érythémateux disséminé. Nous décidons également de tester notre peptide dans cette athologie et d'évaluer son intérêt thérapeutique.

Afin de respecter la règle des 3R, nous avons décidé de réduire le nombre d'animaux utilisés. Afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (tests de Mann et Whitney) mais aussi de compenser l'hétérogénéité de ces souris, nous analyserons des groupes de 10 souris pour chaque molécule testée, tous les 15 jours pendant 5 ans, soit un total de 3600 animaux (cf. procédures expérimentales). De plus, les souris utilisées pour la partie lupus seront les mêmes que pour la partie Gougerot-Sjögren. Pour répondre à la question du raffinement, les souris seront hébergées par groupes dans des cages de taille réglementaire, sans dépasser le nombre maximal autorisé de souris par cage, et seront rassemblées en groupes sociaux. Les cages seront enrichies avec l'ajout de "nids". Enfin, les souris seront maintenues à une température de 22°C, dans une atmosphère dont le taux d'humidité est de 80% et un cycle éclaircissement/obscurité de 12h/12h, conformément aux conditions optimales demandées par la législation. Elles auront accès à la nourriture et à l'eau de boisson ad libitum. De plus, elles seront anesthésiées avant chaque prélèvement sanguin ou injection. Enfin, pour surveiller la douleur et la limiter, les souris seront observées quotidiennement, en respectant les points limites affichés dans notre animalerie. Nous ne pouvons pas, ici, assurer la règle du remplacement puisque ces études ne peuvent, en aucun cas, être réalisées *ex vivo* car il s'agit d'études précliniques nécessitant l'animal entier.

13192 Evaluation de 2 stratégies pour le développement d'un vaccin contre la Peste Porcine Africaine dans l'espèce porcine

La peste porcine africaine (PPA) est une maladie virale contagieuse, classée danger sanitaire de 1ère catégorie en France. Elle affecte tous les suidés domestiques ou sauvages. Elle induit une forte mortalité chez les porcs domestiques et chez les sangliers européens. Elle sévit historiquement en Afrique sub-saharienne. Depuis son introduction en 2007 en Géorgie, elle a conquis le continent européen (Pologne et Pays Baltes en 2014, Moldavie en 2016, Roumanie, République Tchèque, et Hongrie en 2017. En Septembre 2018, elle s'est fortement rapprochée de la France puisque la Belgique a été atteinte. L'Asie est également touchée en 2018-2019 (Chine, Mongolie, Vietnam et Cambodge). Contrairement à la peste porcine classique (PPC), il n'existe aucun vaccin pour prévenir et enrayer la propagation du virus de la PPA. Le seul moyen de contrôle actuel en élevage est le renforcement des mesures de biosécurité et l'abattage de tous les porcs dans les élevages infectés. Aucun moyen de lutte n'est disponible pour enrayer l'avancée de la PPA dans les populations de sangliers atteintes. Le développement de vaccins sûrs et efficaces ciblant les sangliers sauvages en particulier représente donc un des enjeux de l'émergence de la PPA en Europe.

Pour cela, nous allons implémenter 2 stratégies basées sur des caractéristiques différentes. La première consiste à disposer d'une souche de virus PPA atténuée qui est proche d'une souche virulente capable d'induire une réponse immunitaire contre le virus sans pour autant induire de pathologie forte (peu de symptômes de la maladie, faible virémie). Nous disposons d'une telle souche au laboratoire que nous proposons ici de caractériser plus finement en terme de pathogénie induite et de mécanismes potentiels protecteurs vis-à-vis d'une épreuve avec la souche mère. Cette étude sera réalisée au cours de la première procédure du projet. Une autre stratégie consiste à disposer de protéines spécifiquement sélectionnées par rapport à une probabilité forte que ces protéines soient des protéines vaccinales. Nous avons déjà implémenté avec succès ce type de stratégie pour un autre pathogène. Ces protéines seront transportées par un vecteur appelé adénovirus pour augmenter le potentiel vaccinal des protéines sélectionnées. Nous disposons de 2 adénovirus différents et ces adénovirus peuvent être inoculés soit par la voie intramusculaire, soit la voie oronasale. A l'heure actuelle, nous ne savons pas quel adénovirus et quelle voie d'inoculation sera la plus efficace. C'est pourquoi nous proposons d'étudier ces différents paramètres à l'aide d'une protéine du virus de la PPA déjà connue pour induire la production d'anticorps lorsqu'elle est inoculée chez le porc : la protéine VP72. Cette étude fera l'objet de la procédure n°2. A l'issue de cette procédure nous connaissons les paramètres les plus adaptés pour évaluer le potentiel vaccinal d'un cocktail de protéines nouvellement identifiées comme étant des protéines potentiellement vaccinales. Et cela sera évalué au cours d'une 3ème procédure. L'ensemble de ces procédures

sera réalisé avec des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) pour lesquels nous avons développé le modèle d'infection par le virus de la PPA.

Nos procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R. Tout d'abord, l'estimation du nombre de porcs nécessaires est basée sur les activités récentes de notre laboratoire. En effet, en se basant sur les données cliniques et biologiques recueillies lors d'expérimentations précédentes ayant permis de mettre au point le modèle infectieux avec la souche virulente Georgia 2007/1, un maximum de 116 porcs seront nécessaires sur les 5 années de validité du projet. Aucune méthode alternative n'existe actuellement pour évaluer l'efficacité vaccinale d'une souche atténuée de PPA ou d'adénovirus recombinants, autre que l'espèce animale cible, le porc. Enfin, pour le raffinement, des mesures visant à assurer des conditions d'hébergement limitant l'anxiété potentielle des animaux (accès à l'eau et à la nourriture à volonté, enrichissements de l'environnement par des objets manipulables, présence de lampes chauffantes et de plaque de couchage, etc.) et à limiter la souffrance seront appliquées. Un soin particulier sera apporté au suivi clinique de chaque animal. Des observations basées sur des atteintes de points limites (réactivités des animaux à des stimuli, hyper- et hypothermies, pertes d'appétits et/ou pertes de poids sévères) ou l'apparition de douleurs ou de blessures sont prévues pour limiter la souffrance éventuelle des animaux.

Ce travail, outre une meilleure compréhension des mécanismes de protection liés à l'infection par une souche atténuée, permettra d'identifier des pistes de développement rationnel d'un vaccin contre la peste porcine africaine si possible in fine administrable par voie orale.

13193 La douleur est une sensation complexe et fortement subjective dont l'un des aspects majeurs est sa composante émotionnelle. Parmi les nombreuses structures impliquées, l'amygdale a été identifiée comme étant l'un des noyaux clefs dans la modulation des émotions, anxiété ou douleur. Décrypter la microcircuitry amygdalienne et comprendre comment elle régule l'information constitue une importante perspective dans le traitement de pathologies ayant une forte composante émotionnelle. Il a en effet été récemment montré que l'ocytocine, un neuropeptide d'origine hypothalamique, régule son activité afin d'exercer un effet anxiolytique. Dans ce contexte, nous cherchons à caractériser et à comprendre l'effet de la sécrétion d'ocytocine au sein de l'amygdale sur la composante émotionnelle de la douleur.

Le but de cette étude menée *in vivo* et *in vitro* chez le rongeur est de mesurer l'impact de la sécrétion d'ocytocine dans l'amygdale centrale sur les aspects émotionnels, anxio-dépressifs et sensoriels en lien avec une douleur chronique neuropathique.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : La nociception, la douleur et l'anxiété étant des processus sensoriels et émotionnels complexes, il n'est pas possible d'effectuer leur évaluation *in vitro* ou *in silico*. On ne peut donc pas s'affranchir de l'animal entier.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux a été déterminé au nombre minimum requis pour obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi (matériel de nidification, bâton à ronger), et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Les chirurgies seront toutes effectuées sous anesthésie et analgésie adéquat, et les animaux maintenus au chaud et surveillés jusqu'au réveil complet, avec traitement complémentaire analgésique. Après réveil post-opératoire et pour les 4 jours suivants, nous effectuerons un suivi de l'état post-opératoire de l'animal. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche de scoring permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet: 600 souris

13194 Actuellement, les dispositifs médicaux sont des produits de santé qui se développent fortement, avec des applications extrêmement variées.

Ils sont par définition, destinés à être mis en contact avec le corps humain. Par conséquent, ils constituent une source potentielle d'effets indésirables : allergies, réactions inflammatoires localisées ou généralisées, etc.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques pour pouvoir obtenir le marquage CE permettant la mise sur le marché. L'utilisation d'animaux est à ce jour indispensable pour y parvenir intégralement. De même, il est indispensable d'évaluer l'efficacité de ces dispositifs, afin de s'assurer du bénéfice réel apporté au patient.

Les dispositifs médicaux sont répartis en quatre classes selon le risque croissant. La classe III recense les produits avec un risque potentiel très sérieux pour l'homme.

Le présent projet consiste à évaluer la performance et la tolérance locale de dispositifs médicaux de type III, formulés à base de biomatériaux injectables et résorbables.

Ces dispositifs peuvent être utilisés pour diverses applications : ophtalmologie, traitement de l'arthrose, cicatrisation, chirurgie réparatrice, etc.

L'évaluation se fera après injection sous-cutanée et/ou intradermique chez le rat, le lapin ou le porc. Il est envisagé l'utilisation de 500 rats, 300 lapins et 150 porcs en 5 ans, permettant l'évaluation d'au moins 10 dispositifs différents par espèce. La durée d'implantation dépendra de la composition exacte des dispositifs médicaux et du champ d'application envisagé.

L'injection des produits à tester provoque peu de dommages chez les animaux. Cependant, si un produit n'est pas biocompatible, on observera une inflammation persistante. Dans ce cas, un traitement sera mis en place afin de réduire la douleur des animaux. Des points limites sont également définis, à savoir des signes cliniques précis qui, s'ils sont observés, engendreront l'arrêt de l'expérience car la balance entre le bénéfice scientifique et la souffrance animale ne sera à ce stade plus acceptable.

Tous les animaux feront l'objet de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des essais.

Les animaux seront hébergés autant que possible en groupe et en environnement enrichi.

La réduction du nombre d'animaux a été réalisée au maximum, tout en permettant au projet d'obtenir un nombre suffisant de données pour répondre à la problématique. Pour cela 2 à 4 produits différents pourront être implantés chez le rat et 2 à 10 produits différents pourront être implantés chez le lapin et le porc.

Des procédures analgésiques, anesthésiques et des suivis cliniques ont été intégrés au protocole expérimental permettant de suivre et de prévenir tout signe de mal-être chez les animaux.

Des techniques d'imagerie seront mises en œuvre autant que possible afin de permettre le suivi longitudinal des produits, et ainsi de réduire encore le nombre d'animaux utilisés tout en raffinant le protocole.

Le bénéfice attendu est de pouvoir mettre sur le marché des dispositifs médicaux sûrs pour le patient, et dont les éventuels effets secondaires sont connus.

Ces études permettront en outre de vérifier que les produits ne sont pas dégradés trop rapidement par l'organisme, afin d'obtenir un effet à moyen terme.

13195 Les arbovirus (virus transmis par les insectes ou les tiques) constituent un risque majeur pour la santé humaine et animale. Nous nous intéressons à l'étude d'arbovirus appartenant à trois genres (Orbivirus, Coltivirus et Seadornavirus) qui peuvent infecter l'homme, les rongeurs et/ou les animaux de rentes. Les rongeurs contribuent aux cycles naturels de ces virus. Ces virus sont transmis par piqûre de moucheron piqueur, de moustiques ou morsure de tiques. Nos études interviennent dans un cadre de recherches fondamentales et à visées thérapeutiques. L'exemple d'actualité est le virus de la fièvre catarrhale ovine ou 'bluetongue virus' (BTV). Depuis 1998, l'Europe a connu plusieurs épidémies de BTV. Les orbivirus, coltivirus et seadornavirus représentent donc une menace importante en santé animale/humaine ainsi qu'en matière de sécurité des aliments. Le modèle murin est un modèle pertinent pour l'étude de la


réplication/transmission et des stratégies à visées thérapeutiques (nouveaux vaccins et/ou antiviraux) des arbovirus.

Nous proposons d'utiliser le modèle murin afin de répondre à des questions, particulièrement en ce qui concerne les orbivirus :

(i) préparer des sérums, contre de nouvelles protéines virales identifiées par analyses bio-informatiques, et destinés à détecter l'existence de ces protéines en cellules infectées.

(ii) évaluer l'efficacité des nouvelles approches thérapeutiques (nouvelles stratégies vaccinales et antivirales à large spectre) : (a) évaluer la protection conférée par de nouveaux vaccins vis-à-vis d'une épreuve avec nos virus vivants. Ces nouveaux vaccins sont basés sur des protéines virales. (b) évaluer des molécules thérapeutiques qui inhibent la réplication des virus en culture cellulaire, en tant qu'antiviraux potentiels (stratégie complémentaire à la vaccination).

Les protocoles ont été conçus dans les règles des 3 R avec une prise en compte du raffinement, notamment en hébergeant les animaux en groupes sociaux, dans des environnements enrichis et en euthanasiant les animaux dès qu'ils présentent une atteinte des points limites. Ces expériences ne peuvent se passer de l'utilisation de souris pour comparer les résultats obtenus *in vitro* à ceux *in vivo* et permettront de statuer sur l'intérêt d'utiliser des modèles *in vivo* pour d'autres virus d'intérêt. Le nombre maximal de souris nécessaires pour les 4 procédures est de 1135 souris. Ce nombre, réduit au maximum, prend en compte les échecs possibles de certaines expérimentations dus à l'absence de réplication des virus.

13196 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche d'un traitement contre le cancer colorectal. De nombreux progrès ont été réalisés récemment en termes de thérapie, notamment avec l'immunothérapie, mais trop de cancers n'ont pas de solution thérapeutique.  Les tests *in vitro* permettent de faire un premier criblage sur les molécules ayant un effet ou non sur les cellules cancéreuses. Par contre, lorsque l'on veut viser les mutations responsables du passage du stade polypes aux premiers stades de cancer, les études *in vivo* sont nécessaires et ne peuvent pas pour le moment être remplacées. D'où notre besoin de travailler avec un modèle de souris développant spontanément des polypes évoluant en tumeurs malignes.

Nous souhaitons étudier l'effet d'un anticorps dirigé contre notre protéine cible impliquée dans le développement tumoral du cancer colorectal. Nous avons choisi un modèle APC Min/+ car ces souris présentent spontanément des tumeurs dans l'intestin et le colon.

Notre expérimentation s'articule en 2 phases :

Dans une première phase, nous effectuerons une expérience de mise au point sur des souris APC Min/+ non traitées. Nous visualiserons le nombre de tumeurs spontanées à 6, 9 et 13 et 16 semaines de vie ce qui nous permettra de déterminer le moment idéal pour traiter les animaux de la phase 2. Nous mettrons également au point les conditions de prise d'image des tumeurs et de récupération des échantillons qui serviront aux expérimentations *in vitro*.

Dans une 2ème phase, les souris seront traitées par injection intra-péritonéale durant 6 semaines. Nous testerons 3 combinaisons de traitement différentes. L'effet de ces thérapies sur la progression du cancer sera observé au bout d'1, 3 et 5 semaines de traitements.

Le modèle *in vivo* est indispensable dans ce contexte scientifique. 948 souris maximum seront nécessaires pour ce projet sur 5 ans.

Le nombre de souris annoncé est justifié à la fois d'un point de vue technique (protocoles développés et nécessité statistique) et scientifique car les produits testés pourront passer en étude clinique si leurs résultats sont positifs. La procédure 1 nous permettra de mettre en place les techniques et de déterminer le moment le plus opportun pour débuter nos traitement (3 anticorps différents testés). Nous utiliserons 12 souris pour la procédure 1 et 936 souris pour la procédure 2. Ces dernières serviront pour les essais précliniques avec thérapies et donneront des résultats statistiquement exploitables. L'utilisation d'une seule procédure de mise au point nous permet de réduire le nombre d'animaux utilisé pour valider des essais précliniques. De plus, nous utiliserons

des mâles et femelles en quantité égale dans chaque groupe afin de réduire davantage ce nombre et d'utiliser au maximum les portées obtenues par les croisements.

Le bien-être des souris sera évalué tout le long de l'étude. Les signes de stress ou de souffrance de l'animal (perte de poids supérieure à 20%, présence de sang dans les selles, prolapsus, piloérection, prostration) seront surveillés. Le raffinement des conditions d'hébergement sera appliqué notamment par un enrichissement de leurs milieux de vie leur permettant de se faire un nid contribuant ainsi à leur bien-être.

13197 La douleur est une sensation complexe qui implique de nombreux noyaux cérébraux appelés matrice de la douleur. Parmi ces structures, certains noyaux corticaux et sous-corticaux, qui participent activement à l'aspect émotionnel de la douleur, sont largement innervés par des projections axonales ocytocinergiques (OT) originaires de l'hypothalamus. Ce projet, basé sur les nouvelles possibilités offertes par la manipulation des vecteurs viraux, consiste à identifier et caractériser les projections OT, vers les structures de la matrice de la douleur, qui sont recrutées lors d'un événement douloureux. Les catégories de douleur pathologiques ayant des étiologies différentes sous-tendues par des mécanismes cellulaires et moléculaire éloignés, il sera nécessaire de tester nos hypothèses sur différents modèles de douleur inflammatoire et neuropathique induit pharmacologiquement ou par approche chirurgicale.

Les résultats attendus permettront à la communauté scientifique de mieux comprendre la physiologie de la douleur et les mécanismes de mise en place des contrôles endogènes neuropeptidergiques.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : La nociception, la douleur et l'anxiété étant des processus sensoriels et émotionnels complexes, il n'est pas possible d'effectuer leur évaluation *in vitro* ou *in silico*. On ne peut donc pas s'affranchir de l'animal entier.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques tout en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner : Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie. La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté tout au long de la procédure. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche de scoring permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale. Les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente.

Nombre d'animaux total : 1440 rats sur 5 ans.

13198 L'obésité est reconnue comme une maladie chronique par l'OMS depuis 1997, définie comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Les études épidémiologiques indiquent qu'en 2015, environ 2,3 milliards d'adultes étaient en surpoids, dont plus de 700 millions d'obèses. Cette prévalence inquiétante s'accompagne en outre d'une mortalité importante : on attribue directement à l'obésité environ 3,5 million de décès par an au niveau mondial. Face à ce contexte, l'armada thérapeutique s'avère relativement pauvre, et s'accompagne en outre de posologies contraignantes et d'effets secondaires non négligeables. Le rôle de la signalisation cannabinoïde dans le contrôle du poids corporel et de la prise alimentaire est aujourd'hui clairement connu. Cette découverte a induit le développement d'inhibiteurs des récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 comme traitement de l'obésité. Ce développement a abouti à l'autorisation de mise sur le marché en France du Rimonabant dans le traitement de l'obésité en 2007. Cependant, la molécule a rapidement été retirée du marché (2008) pour cause d'effets secondaires induisant des troubles dépressifs majeurs liés à l'action du Rimonabant sur le système nerveux central. Depuis, de nombreux laboratoires pharmaceutiques cherchent à modifier leurs inhibiteurs des récepteurs CB1 afin d'en limiter l'accès au niveau cérébral et ainsi éviter les effets secondaires associés.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé X, un agoniste inverse des récepteurs CB1, destiné à l'amélioration de l'obésité, du diabète de type II et de leurs symptômes associés.

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé X sur la prise alimentaire, le poids corporel, la composition corporelle, les dépenses énergétiques, l'activité locomotrice, la régulation glycémique et la régulation lipidique chez des rats rendus obèses par un régime hyperlipidique (60% de l'énergie issue des graisses) pendant 12 semaines préalablement au début des traitements. Ces derniers seront administrés par voie orale pendant 4 semaines alors que les animaux seront maintenus sous le même régime enrichi en graisses.

La présente étude nécessitera l'emploi de 60 rats Sprague Dawley répartis en 5 groupes expérimentaux composés de 8 (Groupe contrôle du modèle sous-alimentation standard) à 13 animaux (Groupes sous-alimentation enrichie : Groupe contrôle du traitement, 2 Groupes traités avec le composé X (dose 1 et 2) et un groupe traité avec un composé de référence).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Nous utilisons ce modèle en routine au laboratoire. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux.

Pour des raisons techniques (mesures de prise alimentaire), les animaux seront hébergés en cages ventilées individuelles mais un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de briquettes de bois et de tubes en cartons. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été calculé à partir des données de la littérature concernant le rimonabant et de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

13199 Chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est utilisée pour le traitement de maladies du système nerveux central comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50000 patients dans le monde sont implantés avec des microstimulateurs.

On sait que la stimulation de certains nerfs périphériques agit aussi directement sur les cellules du système immunitaire pour réguler son activité, ouvrant la voie au traitement d'autres maladies par les techniques d'électrostimulation de nerfs périphériques chez l'humain.

Il a ainsi été montré chez la souris que l'électrostimulation des nerfs périphériques diminue l'inflammation. Ces études ont été à la base d'un essai clinique réalisé avec des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PAR) chez lesquels l'électrostimulation résulte en une amélioration significative des scores cliniques mais qui provoque des effets secondaires importants. Malgré cela, l'électrostimulation constitue une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement chronique des symptômes chez les patients atteints de PAR. L'implantation d'électrostimulateurs à demeure permet non seulement d'éviter les échecs thérapeutiques liés à la lourdeur des traitements pharmacologiques actuels mais également de réduire les effets secondaires en inhibant la réponse immunitaire de façon localisée. L'objectif de nos études consiste donc à approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'action de l'électrostimulation pour permettre la mise au point de nouveau protocole de stimulation nerveuse ne comportant pas ou peu d'effets indésirables pour soigner différentes maladies.

Le présent projet se propose ainsi d'étudier les mécanismes par lesquels l'électrostimulation agit sur le système immunitaire dans le contexte de la polyarthrite rhumatoïde.

Pour cela nous utiliserons un modèle de souris chez lesquelles une PAR expérimentale sera induite expérimentalement. En tenant compte des mesures de réduction et de raffinement mises en place, les contraintes imposées aux animaux ont été évaluées et mises en balance avec les résultats escomptés et permettent d'envisager une balance dommage / avantage favorable à la réalisation de ce projet.

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être envisagé que sur des organismes entiers préservant l'intégrité des interactions entre les systèmes immunitaires nerveux dans un contexte pathologique et non pathologique. La PAR expérimentale a été notamment parfaitement caractérisée chez le souris ce qui permettra une comparaison avec les études précédemment réalisées.

Réduction : Le plan d'étude est conçu pour éviter toute répétition non nécessaire des procédures en réalisant des tests statistiques aussi précocement que possible dans le déroulé des procédures. Par ailleurs, les nombres de souris sont des nombres maximums puisque, pour la procédure 3, nous déterminerons, lors de la procédure 2, quel type cellulaire a un effet et nous ne testerons que les sous-types cellulaires correspondants.

Raffinement : Des mesures de raffinements seront mises en place afin de limiter au maximum les contraintes imposées aux animaux dans le contexte de cette étude : les interventions chirurgicales seront menées suivant un protocole d'anesthésie et d'analgésie en prenant soin de maintenir la température corporelle des animaux en les plaçant sur une couverture chauffante. Le suivi postopératoire inclura un traitement antalgique et une grille d'observation préétablie prévoyant des mesures correctives et la mise en œuvre le cas échéant de points limites précoces et adaptés.

Le nombre total de souris nécessaire pour ce projet est estimé à 1980.

13200 D'origine infectieuse ou liées à la consommation excessive d'alcool ou de régime alimentaire riche en graisses, les maladies du foie deviennent souvent chroniques avec un risque de développement de cancer du foie grave et préoccupant en terme de santé publique. Afin d'améliorer la connaissance de ces maladies, notre équipe se consacre à la caractérisation des facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la régulation de ces maladies du foie que l'on appelle hépatites. Nos travaux indiquent que l'infection virale des hépatocytes induit une forte production d'une molécule nommée CXCL14. Cette molécule est responsable de la migration de cellules de défense de l'organisme et pourrait jouer un rôle important dans l'organisation de la défense de l'organisme contre l'infection virale. Notre projet est de soumettre des souris incapables de produire cette molécule CXCL14 à une hépatite virale murine pour comprendre le rôle de ce facteur dans la défense anti-virale. Les animaux infectés seront étudiés pendant 5 jours. Les organes prélevés (foie, rate et cerveau) seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et cérébrale et l'avancée des processus de défense immunitaire du foie. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 168, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces et permet d'étudier la réponse physiologique d'un individu déficient pour une molécule d'intérêt pour évaluer son rôle.

- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ; et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 2 organes touchés par la maladie pour ainsi récolter un maximum d'informations qui viendront compléter celles déjà obtenues.

- Nous avons raffiné le protocole en prenant soin d'ajouter dans la cage des souris infectées un bloc de gélose humide pour leur permettre de se restaurer alors qu'elles auront une fièvre élevée du fait de l'infection virale, des points limites adaptés ont été définis et une anesthésie locale est mise en œuvre pour la collecte de sang.

Ce travail permettra de préciser le rôle du facteur CXCL14 dans la mise en place de la maladie « hépatite virale » chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie.

13201 Selon l'OMS, le diabète est une maladie chronique grave qui se déclare lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline (hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, ou glycémie), ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser correctement l'insuline qu'il produit. Il y a alors un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage du glucose apporté lors des différents repas de la journée. Il en résulte alors une augmentation du taux de glucose dans le sang, c'est l'hyperglycémie. L'hyperglycémie, conséquence courante d'un diabète non maîtrisé, peut, au fil du temps, provoquer de graves lésions cardiaques, vasculaires, oculaires, rénales et nerveuses. Le diabète est un important problème de santé publique, et il est l'une des quatre maladies non transmissibles prioritaires ciblées par les dirigeants mondiaux.

Une hausse régulière du nombre des cas de diabète et de la prévalence de la maladie a été enregistrée ces dernières décennies. En effet, à l'échelle mondiale, on estime à 422 millions le nombre des adultes qui vivaient avec le diabète en 2014, contre 108 millions en 1980. La prévalence mondiale du diabète (normalisée selon l'âge) a presque doublé depuis 1980, passant de 4,7 à 8,5 % de la population adulte. Ces chiffres reflètent l'augmentation des facteurs de risque associés comme le surpoids et l'obésité.

La régulation de la fonction des cellules à insuline (c'est-à-dire la sécrétion d'insuline) et leur survie jouent un rôle central dans la progression du diabète. D'une part, la quantité d'insuline à sécréter doit être strictement régulée pour assurer un approvisionnement des tissus en sucre (glucose) tout en prévenant les hypoglycémies et les hyperglycémies. D'autre part, la régulation de la masse des cellules à insuline représente un problème crucial pour la compréhension du diabète.

Le muscle constitue l'organe le plus sensible à l'insuline de l'organisme et qu'après un repas il joue un rôle majeur dans l'équilibre glycémique de l'organisme. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que le muscle et les cellules à insuline pouvaient être interconnectées. En effet, le muscle est un organe capable de sécréter de multiples facteurs (appelés myokines) pouvant avoir un impact favorable ou défavorable sur la fonction des organes / tissus. Dans le contexte du métabolisme du glucose, le muscle joue un rôle actif en contrôlant la quantité de sucre dans le sang. Par exemple, le muscle est un site majeur de stockage du sucre sous l'action de l'insuline. Ceci est crucial pour faire face à une augmentation rapide de la quantité de sucre dans la circulation sanguine après un repas. De plus, le muscle peut influencer la sécrétion et le fonctionnement de l'insuline en interagissant avec le pancréas par le biais de facteurs (Myokines). En effet, nous avons montré que les cellules saines du muscle ont un impact positif sur la fonction et la survie des cellules à insuline. A contrario, les myokines provenant de cellules musculaires diabétiques induisent la mort des cellules à insuline. Ainsi, nous avons mis en évidence une nouvelle voie de communication entre le muscle et les cellules à insuline qui est modulée par l'état diabétique et est susceptible de contribuer au maintien d'une masse de cellules à insuline fonctionnelle chez des sujets sains, ainsi qu'à une diminution du diabète. Lors d'étude antérieures menées sur cellules musculaires saines et diabétique, un ensemble de facteurs (Myokines) sécrétés par le muscle pourraient constituer des molécules d'intérêts pour traiter le diabète.

L'objectif de cette demande est de déterminer l'effet des myokines identifiées sur la survie et la fonction des îlots pancréatiques et d'élucider des mécanismes impliqués, ou jouant un rôle, dans l'insulino-sécrétion. Nous avons choisi le modèle du rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme. Cette étude sera réalisée sur des rats Wistar mâle sur une durée de 5 ans. Au maximum 4 myokines pourront être étudiées par an.

Principe de réduction :

Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (4800 rats). Le nombre de 4800 rats pour la période de 5 ans peut se justifier de la manière suivante : 4 myokines seront étudiées au maximum par an, 4 concentrations maximum, 1 temps d'incubation en culture avant les tests et 12 répétitions pour obtenir des résultats statistiquement analysables

(expérience du laboratoire lors de projets antérieures). Pour nos différents tests et pour avoir suffisamment de cellules, 5 pancréas sont nécessaires par molécules, par concentration étudiée, par temps de culture et par nombre de répétitions de l'expérience (1 pancréas pour analyse de survie + fonction des îlots, 2 pancréas pour les études de génomiques et 2 pancréas pour les études de protéomique). Ainsi, au maximum par an 4 molécules x 4 conditions x 1 temps d'incubation x 5 pancréas x 12 répétitions = 960 rats par an. Donc sur 5 ans, 960 x 5 = 4800 rats.

Raffinement :

Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement. Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes d'anesthésie et de prise en charge des animaux tout au long de leur séjour dans notre animalerie.

Remplacement :

Les lignées cellulaires connues aujourd'hui (Rinm5F, INS-1, Min-6), ne répondent pas à une stimulation au glucose en terme de sécrétion d'insuline. Ainsi, le recours à des îlots pancréatiques, et donc à des animaux, est indispensable.

13202 Le besoin en nouveaux médicaments anticancéreux (chimiothérapie) est évident au vu des effets secondaires des médicaments actuellement autorisés ou de l'absence de traitements efficaces contre certains types de cancer. En effet, certaines chimiothérapies induisent des effets secondaires très graves et plus inquiétant encore, certains traitements impliquent un très mauvais pronostic. Des traitements chimiothérapeutiques alternatifs sont donc requis. L'un des médicaments les plus fréquemment utilisés contre le cancer est un complexe de platine : le cis-platine. Actuellement, ce médicament et ses dérivés sont indiqués dans plus de 50% des traitements contre le cancer.

Néanmoins, le cis-platine souffre encore de plusieurs inconvénients importants dont des effets secondaires graves. Son succès phénoménal a stimulé la recherche dirigée vers de nouveaux médicaments anticancéreux à base de métaux autres que le platine qui pourraient induire moins de toxicité. Parmi les candidats potentiels, les complexes de Ruthénium sont devenus des acteurs de premier choix en montrant des résultats extrêmement prometteurs.

Dans le cadre de ce projet, de nouveaux composés à base de Ruthénium ont été développés et ont montré une activité très intéressante *in vitro* sur des cellules cancéreuses. L'objectif de cette étude est de déterminer l'activité antimétastatique de ces complexes sur un modèle de métastases d'origine colorectale ou d'origine mammaire. Dans ce contexte, la souris est le meilleur modèle animal permettant d'atteindre nos objectifs. Nous utiliserons un modèle de métastases colorectales et un modèle de métastases mammaires.

A 9 semaines, la souris sera injectée en intraveineuse avec des cellules tumorales transformées pour être luminescentes (CT26-luc, 4T1-Luc), suivie le lendemain et au 7ème jour d'une injection de composés à base de Ruthénium en intrapéritonéale. La croissance des tumeurs sera visualisée par plusieurs imageries de la bioluminescence jusqu'au 15ème jour, date à laquelle les souris seront mises à mort. Les images de la croissance tumorale par imagerie optique, permettront ainsi de déterminer l'efficacité des composés à base de Ruthénium.

Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera 864 souris.

Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Des études préalables ont permis de sélectionner les composés les plus efficaces, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés.

La souffrance des souris sera réduite au maximum. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence, son comportement,

révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera la mise à mort anticipée de l'animal.

Ainsi, grâce à ces études, nous pourrions identifier de nouveaux composés avec des propriétés antimétastatiques.

13203 L'objectif principal du projet est de comprendre la dynamique de population de la Cigogne blanche en identifiant les facteurs biotiques, tels que les ressources alimentaires, la densité de population, la qualité des habitats, et abiotiques, tels que les variations climatiques, qui affectent les paramètres démographiques (survie, succès reproducteur, fécondité, recrutement, dispersion) et la dynamique des populations de cette espèce.

Le projet s'intéressera lors de plusieurs saisons de reproduction aux liens potentiels entre les types d'habitats d'alimentation (prairies, marais, champs cultivés) utilisés par les adultes pendant la période de reproduction et la condition corporelle ainsi que l'état de santé des poussins produits. Pour cela des poussins seront mesurés, pesés et échantillonnés (plumes, sang) et leurs caractéristiques phénotypiques (taille, masse) et physiologiques seront reliées aux types d'habitats utilisés par leurs parents pour s'alimenter aux alentours du nid. Les échantillons biologiques seront utilisés pour doser les quantités de polluants (métaux lourds, composés perfluorés), les hormones thyroïdiennes et mesurer la longueur des télomères (ADN située à l'extrémité des chromosomes et sensible à l'inflammation et au stress). Les résultats issus du projet permettront d'identifier en quoi la qualité des habitats d'alimentation affecte le degré de contamination des jeunes ainsi que leurs paramètres physiologiques et démographiques.

Au total nous manipulerons un maximum de 250 poussins.

Les mesures mises en place pour respecter la règle des 3 R sont :

Remplacer : il n'est pas possible de remplacer l'espèce cible du projet puisqu'il s'agit d'une étude spécifique sur le comportement d'une espèce dans son milieu naturel.

Réduire : le nombre d'individus total est un compromis entre faisabilité sur le terrain et représentativité des changements observés. L'échantillon maximum de 250 poussins représente moins de 3% de l'ensemble des poussins produits sur la zone d'étude.

Raffiner : toutes les précautions connues permettant de réduire l'impact de nos manipulations sur les individus sont scrupuleusement suivies. Le temps de manipulation par oiseau est limité au minimum et des précautions sont prises pour diminuer le stress dû à la capture. Nous avons déjà manipulé de nombreux poussins dans le cadre d'un programme de baguage depuis 40 ans et n'avons pas enregistré d'accident majeur sur 4500 individus bagués.

13204 Ce projet a pour objectif principal d'étudier le profil pharmacocinétique (processus d'absorption, distribution, métabolisation et élimination) d'une molécule chez le chien. L'étude pharmacocinétique est une étape importante dans le développement du médicament, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être efficace chez l'homme.

Pour cela, des prélèvements sanguins et/ou urinaires répétés sont réalisés chez le chien vigile ou anesthésié après l'administration du candidat-médicament. Ces prélèvements (sang et urine) seront utilisés pour mesurer au cours du temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites, et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 100 chiens sur 4 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

• Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour étudier la pharmacocinétique d'une nouvelle molécule. Avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le chien est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

- Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.
- Raffinement : Dans ce projet, le raffinement est obtenu par :
 - la mise au point de procédures rigoureuses
 - le prélèvement d'un volume minimal de sang grâce à l'amélioration de la sensibilité des techniques de dosage
 - le recours à des procédures les moins invasives possibles
 - le suivi d'éventuels signes cliniques
 - la détermination des points limites

13205 Des études chez l'Homme ont montré que les patients dépressifs pouvaient présenter des troubles de l'olfaction. Parmi les différentes dimensions de la perception olfactive (altérations du seuil de perception, de la discrimination, de l'identification), celle qui semble le plus robustement touchée chez l'homme dans la dépression est le jugement de la valeur hédonique, le caractère plaisant d'une odeur. Cette dimension hédonique des odeurs est un paramètre dominant de la perception olfactive puisqu'elle guide notre comportement d'approche ou de retrait. Une altération de la dimension hédonique positive (anhédonie) des odeurs provoque des troubles de la prise alimentaire ou de l'humeur, ce qui a un impact fort sur la dégradation de la qualité de vie. Dans ce projet, il va s'agir de comprendre les mécanismes neuronaux impliqués dans les altérations de la perception des odeurs lors de la dépression.

Nous allons étudier la réponse hédonique aux odeurs à l'âge adulte dans deux modèles animaux complémentaires de la dépression, le stress chronique léger imprédictible et le stress précoce. La majorité des études sur le stress chronique chez l'animal ont utilisé des mâles alors que deux fois plus de femmes que d'hommes sont touchées par la dépression ce qui suggère un effet genre important dans la pathophysiologie de la maladie que nous proposons de prendre en compte. Nous analyserons également l'effet de l'enrichissement avec des odeurs sur le niveau d'anxiété, de dépression et d'anhédonie des souris grâce à des tests comportementaux standards. Les réseaux neuronaux impliqués dans le traitement des odeurs seront analysés et pourront être manipulés.

D'un point de vue fondamental, ces résultats apporteront des éléments déterminants pour la compréhension des mécanismes de codage de la valeur hédonique de l'odeur et ses altérations lors de la pathologie. Il s'agit d'un pan entier de la physiologie olfactive dont les processus fondamentaux restent très méconnus. Ce travail, d'un point de vu plus appliqué, devrait fournir de nouvelles pistes thérapeutiques pour promouvoir le bien être par les odeurs. Ainsi, ce projet permet d'envisager des bénéfices fondamentaux et cliniques évidents.

L'étude des processus physiologiques et plus particulièrement l'étude des bases neuronales du comportement nécessite l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur modèles strictement *in vitro*. La très grande majorité des études sur les bases neurales de la perception olfactive a été menée chez la souris C57Bl6J adulte. C'est donc sur ce même modèle que notre projet sera mené. 720 souris sur une période de 5 ans seront nécessaires à ce projet.

La signature neurale de l'altération de la perception des odeurs lors de la dépression sont étudiés principalement post mortem à l'échelle cellulaire et moléculaire. Nous modulerons également l'activité des circuits neuronaux pendant le comportement de l'animal. Nous resterons très attentifs au bien-être animal et une surveillance accrue (mesure du poids, administration d'antalgique, observation de l'animal) sera effectuée lors des chirurgies.

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

- « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.
- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats. De plus, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous

corrélons (grâce à des statistiques adaptées) le comportement et les paramètres cellulaires sur les mêmes animaux et poursuivrons le développement d'un modèle bio-informatique.

- « Raffiner » toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et locale et des traitements préventifs (antalgiques) seront utilisés afin de réduire les risques de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés pendant toute la durée du protocole. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur. Le modèle murin de dépression est un outil pertinent pour étudier l'impact de cette pathologie sur la perception des odeurs et donc à plus long terme sur la prise alimentaire et les interactions sociales et pourra aussi être utilisé afin de tester de nouvelles pistes de remédiation. Les procédures de niveaux faibles à modérées prennent en compte au mieux le bien-être des animaux par un suivi régulier des animaux et par une mise à mort la plus éthique possible (Raffinement).

13206 Le but de cette étude est d'affiner les paramètres (doses, fréquences d'administration) d'un traitement pour l'achondroplasie, qui est la forme de nanisme la plus fréquente. Ceci se place dans la continuité d'un projet précédent. Cette maladie est due à une modification dans un gène qui résulte en l'arrêt de la croissance osseuse. Il a été montré dans une étude précédente que nous avons trouvé un traitement potentiel pour ce nanisme.

Nous avons des souris qui présentent la même maladie que les patients. Nous utilisons dans ce PEA une souche à phénotype dommageable (troubles de la locomotion, paralysie unilatérale, paralysie bilatérale avec atteinte de la vessie, troubles respiratoires). Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux afin de mettre en place un potentiel traitement chez l'Homme. Les projets précédents nous ont permis de choisir la molécule de référence qui a démontré son efficacité sur la croissance de souris nouveau-nées. Ce projet a aussi comme objectif de tester plusieurs candidats optimisés de la molécule de référence pour continuer le développement pharmacologique de la molécule. Les résultats de ce projet nous permettront de transposer l'utilisation de ce traitement de façon plus adéquate chez l'enfant.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie, Ce potentiel traitement permettrait de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications, notamment les paralysies de la moelle épinière.

Afin de satisfaire avec les exigences de la règle des 3R, nous avons déjà mis en place différentes stratégies. Tout d'abord dans un but de remplacement nous avons choisi les molécules optimisées après avoir réalisé des expériences sur cellules afin de ne tester chez l'animal que les molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé. Dans un but de réduction nous avons estimé le nombre d'animaux strictement nécessaire fondé sur un calcul de puissance statistique et basé sur notre expérience des résultats précédents. Enfin dans un but de raffinement des expériences nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux au cours des procédures grâce à des grilles de suivis et l'établissement de points limites précoces.

Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 4722 souris soit 1112 souris dans la procédure 1, 1400 souris dans la procédure 2, 1700 souris dans la procédure 3, et 510 souris dans la procédure 4.

13207 Notre étude en recherche fondamentale porte sur une protéine présente chez tous les organismes vivants. De récentes analyses ont révélé que des mutations de notre gène d'intérêt sont fréquemment trouvées dans les cellules tumorales de patients atteints de myélome multiple. Une mutation semblable a également été trouvée associée à d'autres types de cancer (médulloblastome et leucémie aiguë). Ces données indiquent que l'altération de l'activité de notre protéine peut contribuer au développement de tumeurs et de cancers. Cependant, nous ne connaissons pas, à l'heure actuelle, la fonction précise de cette protéine, ni son mécanisme d'action. Afin de comprendre cela, nous souhaiterions étudier les effets de l'absence de notre protéine chez la souris avec comme perspective, la mise en évidence de nouvelles cibles potentielles pour le traitement des cancers liés à un dysfonctionnement de notre protéine. Nous souhaiterions ainsi comparer le

contenu moléculaire de peau provenant d'une population contrôle de souris avec de la peau provenant d'une population où notre protéine est absente. L'absence de notre protéine sera induite par un protocole d'injection au tamoxifène. Les souris seront euthanasiées directement après le protocole d'injection, afin d'étudier la composition moléculaire des tissus impactés. Ainsi, la seule procédure invasive et pouvant générer une souffrance animale pour cette étude sera l'injection intrapéritonéale.

Remplacement : Des études préliminaires en culture cellulaire nous ont permis d'identifier de potentiels cibles de notre protéine, cibles qui s'avèrent être particulièrement sensibles au contexte environnemental. Il faudrait à présent valider ces cibles dans un organisme multi-cellulaire étant très proche de l'homme au niveau des mécanismes d'action biologique : la souris se présente donc comme l'organisme idéal pour cette étude. En effet, l'étude de cellules de peau en culture *in vitro* ne permettra pas d'étudier l'impact de l'absence de notre protéine dans un contexte physiologique et tenant compte de l'environnement cellulaire (tissu vascularisé, réponse immunitaire, hétérogénéité cellulaire du tissu et interactions entre les différents types cellulaires, jonctions, dynamique du tissu tel que développement et différenciation cellulaire, effet sur l'homéostasie et sur l'intégrité). De plus, s'il existe des protocoles de mise en culture de peau *in vitro*, ils nécessitent comme matériel de départ une biopsie de peau humaine, non compatible avec un protocole de délétion de notre protéine d'intérêt. Il ne nous serait donc pas possible d'étudier l'effet moléculaire de l'absence de notre protéine dans une culture de peau humaine *in vitro*.

Réduction : Les contrôles nécessaires, la mise au point des conditions expérimentales optimales pour induire une absence de notre protéine ainsi que la comparaison moléculaire en elle-même nécessitera l'utilisation de 10 souris contrôles et de 10 souris tests, soit 20 souris en totalité.

Raffinement : Les souris seront en élevage classique, jusqu'au moment de l'injection de tamoxifène. Le KO sera fait dans la peau, en raison de l'homogénéité, de l'accessibilité du tissu et de la quantité importante par organisme permettant de limiter le nombre de souris à utiliser. Ce KO induisant après 24h une mort par apoptose des tissus, les souris seront euthanasiées 20h après l'injection de tamoxifène. De plus, la surveillance bijournalière en parallèle des injections de tamoxifène nous permettra de sacrifier les souris avant l'apparition de phénotype dommageable.

13208 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le primate lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, des prélèvements sanguins sont réalisés chez le primate vigile ou anesthésié après l'administration du candidat-médicament.

Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance de devenir un médicament. De façon générale, les études pharmacocinétiques sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part (souris, rat, cobaye) et les gros mammifères d'autre part (chien, miniporc, primate non-humain).

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 120 primates sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

- **Remplacement :** Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer la pharmacocinétique d'une nouvelle molécule. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, pour certains médicaments, le primate est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

- Raffinement : Dans ce projet, le raffinement est obtenu par :
 - la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse
 - la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales
 - le recours à des procédures les moins invasives possibles
 - le suivi d'éventuels signes cliniques
 - la détermination des points limite
 - le suivi post-anesthésie de l'état de santé des animaux dans le cas d'une anesthésie, permettant ainsi des soins adaptés pour une bonne récupération.

13209 Le but de ce projet est d'évaluer une potentielle amélioration du phénotype d'un modèle murin de la myopathie à agrégats tubulaires grâce à une approche thérapeutique. Notre travail est axé sur les maladies génétiques rares affectant les muscles. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes touchés dans la myopathie à agrégats tubulaires, on a d'abord utilisé des modèles cellulaires puis des modèles animaux murins. Grâce à ces deux modèles nous avons pu établir les causes de cette maladie ainsi que de possibles cibles thérapeutiques. Nous planifions à présent, d'utiliser un modèle murin pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et valider les cibles thérapeutiques qui ont déjà été sélectionnées *in vivo*. Pour ce projet il y aura 3 lignées : 1 lignée qui est atteinte de la myopathie à agrégats tubulaires, une lignée portant une mutation dans un gène d'intérêt (cible thérapeutique) et 1 lignée dont l'expression d'un gène d'intérêt est réduite de 50% (cible thérapeutique). Nous allons croiser la première lignée avec les 2 autres lignées afin de démontrer que toucher la cible thérapeutique permet d'améliorer le phénotype du modèle murin de la myopathie à agrégats tubulaires. L'utilisation des souris est indispensable pour étudier la physiopathologie de la maladie et l'amélioration du phénotype car ceci pourrait être transféré à l'humain.

Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures. Nous avons préalablement utilisé des modèles murins pour cette maladie afin de déterminer les molécules qui pourraient être testés *in vivo* dans la souris pour réduire le nombre d'animaux. Par contre, seulement le modèle murin permet d'étudier l'amélioration des signes de la maladie dans plusieurs tissus (REMPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris au maximum / groupe sera utilisé pour s'assurer que l'étude soit statistiquement et scientifiquement valable. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement pour éviter toute souffrance. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude) (RAFFINEMENT). Un maximum de 635 souris sera utilisé.

13210 Le maintien de la balance énergétique dépend de l'équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Il existe des systèmes de régulation de la prise alimentaire qui permettent un équilibre entre les apports énergétiques, les dépenses et le maintien du poids corporel autour d'une constante. Une dérégulation du système peut conduire à l'obésité et aux maladies métaboliques, comme le diabète par exemple, qui lui sont associées. De très nombreuses études ont montré une corrélation entre l'obésité et le diabète de type 2 (DT2). Le DT2 est la forme la plus fréquente de diabète (90 % des cas). Il se caractérise par une augmentation du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie), car le corps utilise mal le glucose (sucre) comme source d'énergie. Cette hyperglycémie chronique entraîne de nombreuses complications tels que des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, la cécité, l'insuffisance rénale et des lésions nerveuses.

De nombreux gènes ont été associés à l'apparition du DT2. Cependant, leur fonction dans la survenue du DT2 est inconnue. Notre équipe de recherche s'intéresse à l'un de ces gènes identifiés dont la fonction est ignorée. Nous avons généré des souris génétiquement modifiées, dont le gène

d'intérêt a été inactivé. Les données de notre laboratoire montrent que les animaux ont un poids et un apport alimentaire diminués par rapport aux animaux témoins après 5 mois de régime riche en gras. Ces diminutions sont associées à une amélioration de la glycémie des souris. Nous émettons l'hypothèse que ce gène pourrait être impliquée dans le maintien de la balance énergétique et la dérégulation de son expression pourrait contribuer ainsi au développement du DT2.

Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons deux modèles de souris génétiquement modifiées, dans lequel le gène d'intérêt est spécifiquement activé dans certaines régions du cerveau (centre de régulation de l'appétit et de la satiété). Ainsi, nous pourrons reproduire la suractivation du gène observé chez les patients diabétiques présentant le gène muté. Pour ce faire, nous injecterons un virus (même virus que ceux utilisés pour certaines thérapies géniques) dans la région du cerveau concernée. Les souris seront soumises à un régime alimentaire standard ou à un régime enrichi en gras afin d'induire une obésité. Les paramètres sanguins et métaboliques, la quantité de nourriture ingérée, le poids des souris seront analysés.

Remplacement : La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans dans le pancréas, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduction : Nous utiliserons un total de 176 animaux. Le nombre d'animaux testé dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique adaptée entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction. Par ailleurs, toujours par souci de réduction, plusieurs procédures expérimentales (avec un temps de récupération adaptée pour les animaux) seront réalisées chez les mêmes cohortes de souris.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans des cages avec un enrichissement essentiel pour leur bien-être (Coton + Carton). La litière des animaux est remplacée une fois par semaine. Les animaux sont surveillés par le personnel qualifié tous les jours. Le stress lié aux procédures nécessitant l'isolation des animaux sera diminué par l'usage de cages transparentes rendant leurs congénères visibles. Aucune douleur ou souffrance n'est attendu dans la plupart des procédures expérimentales utilisées mais l'usage d'anesthésique et d'analgésique sera systématique pour les procédures expérimentales potentiellement douloureuses. L'habituation des souris à l'opérateur aura systématiquement lieu quelques jours avant l'expérience et les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation des animaux. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour les analyses biochimiques et les volumes injectés seront adaptés au poids de chaque animal afin de ne pas induire de stress supplémentaire. Chaque semaine, la prise de poids, la quantité de nourriture sont mesurées permettant ainsi un suivi hebdomadaire des souris. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour réduire tout inconfort ou douleur qui se développerait et des points limites seront déterminés pour éviter toute souffrance animale. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, après avis vétérinaire.

13211 Le mélanome est une tumeur cancéreuse qui se développe à partir des cellules de la peau, les mélanocytes, cellules responsables de la synthèse des mélanines, pigments photo-protecteurs contre les rayons UV du soleil. Le mélanome est une tumeur extrêmement agressive possédant un fort potentiel métastatique. S'il est diagnostiqué assez précocement, une chirurgie peut suffire à le traiter. Cependant, dès lors qu'il y a apparition de métastases, le pronostic vital devient très négatif en raison de l'inefficacité de tous les traitements actuels. Lorsque les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions, le taux de survie à 5 ans est inférieur à 50% et lorsqu'elles ont atteint les viscères, la médiane de survie est inférieure à 6 mois. Le mélanome, qui ne représente que 5% des cancers cutanés, entraîne alors 80% des décès associés à ce type de cancer. Actuellement, son incidence double tous les 10 ans (10 000 nouveaux cas en 2007), ce qui en fait un réel problème de santé publique. Récemment de nouvelles thérapies plus spécifiques ont été développées mais les réponses restent transitoires car elles ne traitent pas tous les mélanomes. De plus, après une courte période de rémission, le mélanome acquiert une résistance, augmentant d'environ 2 mois l'espérance de vie du patient. D'autres thérapies ont aussi été mises en place qui réactivent la

réponse immunitaire du patient mais ces thérapies ne donnent une réponse positive que dans 10 à 30% des patients. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux traitements. Nous nous sommes intéressés aux effets anti-cancéreux des médicaments contre le diabète. Plusieurs expérimentations ont montré que ces composés étaient capables d'induire la mort des cellules de mélanomes. Nous avons fait fabriquer de nouvelles molécules, dérivées des médicaments anti-diabétiques déjà existants et nous avons démontré que ceux-ci induisent la mort des cellules de mélanome sensibles mais aussi résistantes aux thérapies actuelles et préservent la viabilité des cellules normales. Afin d'avoir une approche plus physiologique, nous aimerions tester ces différentes molécules sur des modèles de rongeurs en combinaison avec les immunothérapies afin d'observer si nos composés sont capables d'augmenter leurs effets.

Nous utiliserons des souris pour réaliser des modèles de tumeurs générées par des injections en sous-cutanées, d'une part avec des cellules de mélanome de souris et d'autre part nous élargirons notre étude à d'autres cancers (du côlon et du pancréas) car nous avons déjà démontré *in vitro* l'efficacité de nos molécules sur ces types de cancers. Les souris développeront une tumeur sur le flanc où les cellules auront été injectées et les traitements proposés vont permettre de réduire le développement de la tumeur, voire de la faire disparaître.

En ce qui concerne la règle des 3R :

Conformément à la réglementation éthique en vigueur, qui impose de remplacer les animaux, chaque fois que cela est possible, par des modèles *in vitro*, nous avons, au début de ce projet, démontré l'efficacité de nos composés sur des cellules cancéreuses en culture.

En tenant compte des exigences de réduction, également exigé par la législation, nous avons choisi d'utiliser un nombre minimum de souris par groupe expérimental (10 souris) qui nous permet d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

En ce qui concerne le raffinement, les souris seront maintenues dans un milieu enrichi (igloo et tiges qui permettent aux souris de réaliser un nid) et celles-ci seront hébergées en portoirs ventilés à raison de 5 souris maximum/cage (500cm²). Nous réaliserons aussi une imagerie *in vivo* qui est une méthode non invasive permettant un suivi continu de chaque souris et permet l'arrêt de l'expérience avant tout début de mal-être ou de souffrance. Le prélèvement sanguin qui sera réalisé en fin d'expérience sera fait sous anesthésie pour éviter toute souffrance aux animaux.

De plus, les souris seront surveillées quotidiennement par l'équipe animalière et par les expérimentateurs afin de déceler tout signe de souffrance.

Au moindre signe de souffrance, des mesures seront prises par le personnel compétent pour annuler ou limiter au maximum celle-ci.

Le nombre total de souris qui seront utilisées dans ce projet est donc de 1920 souris, réparties sur les 4 procédures expérimentales. Globalement, l'objectif de cette étude est de valider dans des modèles murins, l'efficacité de nos composés contre le diabète, seuls et en association avec des composés inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire. Cette étude *in vivo* constituera le préalable indispensable en vue des premiers essais chez l'Homme.

13212 *Tropheryma whipplei*, l'agent de la maladie de Whipple, est responsable d'une maladie systémique qui peut se présenter sous différentes formes cliniques notamment digestive (gastroentérite), cardiaque (endocardite) ou neurologique.

Des travaux dans notre laboratoire montrent qu'il existe des porteurs asymptomatiques de *Tropheryma whipplei* et qu'une muqueuse intestinale endommagée favorise l'invasion tissulaire par *Tropheryma whipplei*.

Ce projet a pour objectif de clarifier le rôle de l'épithélium intestinal dans l'infection à *T. whipplei*. Pour cela, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées présentant une délétion spécifique de Nod2 dans les enterocytes, inductible par le tamoxifène. Ces souris présentent un défaut de régénération de l'épithélium intestinal qui se traduit par une augmentation de la perméabilité intestinale.

Ce projet a pour but de clarifier le rôle de la délétion spécifique de Nod2 dans les enterocytes dans la maladie de Whipple, il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal où le gène codant pour Nod2 est présent/ou absent. L'expérimentation animale est incontournable, en effet aucune étude *in vitro* ne peut permettre d'étudier le rôle du gène Nod2 dans des conditions physiopathologiques. Le modèle expérimental apporterait des éléments importants dans la compréhension de la translocation de *T. whipplei*.

Pour réaliser notre projet des souris C57BL/6 sauvages ou présentant une délétion spécifique de Nod2 dans les enterocytes seront infectées par *Tropheryma whipplei* via la voie orale (la voie naturelle d'infection par *Tropheryma whipplei*) ou via la voie intrapéritonéale (à titre de groupe contrôle).

Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, une étude pilote sur un effectif réduit ($n = 15$) sera effectuée dans un 1er temps et servira à trouver l'inoculum de *T. whipplei*, parmi les 3 testés, qui induit la plus longue persistance bactérienne. Si cet inoculum est trouvé (sur la base de la charge bactérienne au niveau des fèces des souris sauvages), nous infecterons le reste des animaux sinon le protocole sera arrêté.

Pour chaque étape de notre projet, nous avons utilisé un nombre minimum d'animaux qui ne permettrait d'avoir un résultat significatif. Par ailleurs, pour limiter toute souffrance et/ou angoisse des souris, nous mettons en œuvre des mesures d'acclimatation en zone d'hébergement d'une semaine avant de commencer les manipulations et les expérimentations seront menées par le même expérimentateur.

Pour le confort de l'animal, un enrichissement sera mis en place à l'aide des dômes et les animaux seront suivis quotidiennement y compris les jours fériés. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, foie, rate, cerveau, poumons, cœur, tissu adipeux et intestins).

Pour mener à bien ce projet, le recours au modèle *in vivo* est indispensable.

En outre, Une grille de suivi qui tient compte de l'apparence physique, du poids corporel, des signes cliniques et du comportement de l'animal, est établie, ce qui permettrait de mieux évaluer la douleur et la souffrance de l'animal ainsi des mesures qui vont d'une analgésie par la buprénorphine à l'arrêt de l'expérimentation seront prises en fonction du score obtenu (grille en annexe).

Les critères principaux d'évaluation sont la présence des bactéries dans les fèces et dans différents organes, l'étude de l'aspect histologique dans les organes (tels que le foie, rate, cerveau, poumons, cœur, tissu adipeux et intestins), la réponse sérologique des souris à l'infection et l'étude de la voie de signalisation induite par Nod2. Ce projet nécessitera au total 135 souris.

13213 Le Syndrome de Down (SD) ou Trisomie 21 (T21) est la première cause de retard mental d'origine génétique. Le SD est lié à la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21 et touche 1 naissance sur 600 à 800. Il se caractérise par des déficiences intellectuelles : les personnes atteintes de SD ayant des difficultés d'apprentissage et de mémorisation qui sont liées à des défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. Cette condition est due à la surexpression des gènes du chromosome 21 humain (Hsa21), entraînant de nombreuses perturbations du développement et du comportement. Il est important de comprendre le rôle des différentes régions du chromosome 21 et de ces différents gènes dans le développement du SD. Ainsi, de nombreux modèles murins ont été générés afin d'étudier le rôle des différentes régions du Hsa21 dans les différents symptômes du SD. Par ailleurs, l'amélioration importante, ces dernières années, des outils génétiques nous permet maintenant de créer des modèles rats de SD présentant 3 copies de régions/gènes homologues au Hsa1. Ces modèles rats vont nous permettre de généraliser les résultats obtenus dans les modèles souris. En effet, il peut exister des différences entre les espèces, il semble donc important de valider les résultats obtenus chez la souris dans un autre organisme modèle tel que le rat. Par ailleurs, le rat est physiologiquement et génétiquement plus proche de l'Homme que ne l'est la souris.

Ainsi, différents modèles de rats trisomiques ont été créés afin d'étudier le rôle de différentes régions chromosomiques ou gènes dans le développement du SD. Nous souhaitons analyser ces différents

modèles d'un point de vue comportemental dans un premier temps, au travers de différents tests permettant d'évaluer l'activité circadienne, la locomotion dans un nouvel environnement ainsi que l'apprentissage et la mémoire. Par la suite, nous souhaitons étudier la structure de la rétine afin de mettre en évidence de potentielles anomalies oculaires dans nos modèles rats, les patients atteints du SD présentant des troubles oculaires. Enfin, des analyses morphologiques, moléculaires et histologiques seront réalisées.

Réduction : Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un maximum de 630 rats. Les effectifs ont été calculés afin d'avoir un nombre minimal d'animaux tout en ayant des résultats scientifiquement interprétables. Dans le but d'utiliser tous les animaux produits et de prendre en compte une éventuelle dysmorphie sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement : L'ensemble des tests qui seront réalisés entraîne très peu de stress ou de souffrance pour les animaux. De plus, une phase d'habituation à l'expérimentateur sera réalisée, à raison d'une manipulation par jour, pendant 5 jours, la semaine précédant le début des tests. Les animaux seront hébergés par 2 et disposeront d'un bâton à ronger comme enrichissement. Ils feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleurs seront présentés au vétérinaire, selon l'état de l'animal, un traitement pourra être mis en place, s'il n'interfère pas avec les analyses comportementales. Dans le cas contraire, l'animal sera mis à mort.

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux pour les études concernant le cerveau. En effet, l'étude de déficits cognitifs nécessite un modèle vivant et suffisamment proche de l'Homme pour pouvoir être transposée à l'espèce humaine.

13214 La maladie appelée CADASIL, pour artériopathie cérébrale autosomique dominante avec infarctus sous-corticaux et leuco-encéphalopathie, est due à une mutation d'un gène unique, appelé NOTCH3. Ce gène intervient dans la formation des vaisseaux sanguins et sur leur fonctionnement. Son anomalie a un impact sur l'irrigation du sang dans le cerveau, c'est la forme génétique la plus fréquente de maladie des petits vaisseaux cérébraux.

La maladie se manifeste vers l'âge de 40-45 ans par la survenue d'accidents vasculaires cérébraux à répétition et de troubles cognitifs ; elle évolue vers un état grabataire, une démence et le décès prématuré du patient vers l'âge de 60-65 ans.

Une des manifestations cardinales et extrêmement précoce de la maladie est la présence de lésions de la substance blanche détectées à l'IRM cérébrale dès l'âge de 30 ans. A ce jour, il n'existe aucun traitement pour la maladie CADASIL.

Ce projet vise à mieux comprendre la nature et le mécanisme des lésions de la substance blanche cérébrale, avec un objectif spécifique : réaliser une analyse longitudinale fine de la substance blanche dans un modèle souris mimant le stade précoce de la maladie humaine.

La complexité des interactions vaisseaux –cerveau fait qu'il est fondamental d'étudier ces anomalies sur l'animal vivant, soumis à l'ensemble des systèmes régulateurs, de façon parfaitement intégrée. Il existe un modèle murin sans phénotype dommageable qui récapitule les principales manifestations cérébrovasculaires de la maladie CADASIL, avant l'apparition des symptômes cliniques.

L'objectif de cette étude est d'étudier la substance blanche des souris CADASIL en imagerie post mortem : IRM cérébrale haute résolution et en microscopie électronique chez la souris adulte de 2 à 20 mois.

Ce projet met en jeu une seule procédure, la perfusion intracardiaque de fixateurs en vue de réaliser les analyses IRM et en microscopie électronique sur le cerveau prélevé après la mort de la souris. Pour réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, la perfusion intracardiaque sera réalisée sous anesthésie générale profonde sans réveil.

Le nombre total maximal de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 240 pour une durée de 3 ans. Remplacement : à ce stade, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal

par une méthode alternative. Raffinement : les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocement possible tout signe de douleur.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous analyserons dans un 1er temps, les animaux âgés de 20 mois. S'il s'avère que les résultats sont strictement comparables dans les 2 groupes contrôles, alors nous limiterons les analyses aux âges plus précoces à 1 seul groupe contrôle.

Ce projet de recherche fondamental a pour but d'améliorer notre connaissance des lésions de la substance blanche dans la maladie CADASIL.

13215 Le but de ce projet est de tester des inhibiteurs des NADPH oxydase dans un modèle murin de cholestase hépatique. La cholestase correspond à une diminution ou disparition de l'écoulement de la bile générant une augmentation subite du volume de bile dans les voies biliaires. Cette bile qui s'accumule va avoir un effet néfaste sur les hépatocytes entraînant une inflammation qui aura un impact négatif sur les fonctions hépatiques. La cholestase est souvent due à une obstruction sur le trajet d'évacuation normal de cette bile ou à une maladie hépatique. Les symptômes sont représentés par une jaunisse ou ictère et des démangeaisons inexpliquées. La cholestase peut être la conséquence d'une tumeur, d'une infection, de calculs. Les dosages biologiques mettent en évidence une augmentation de certains marqueurs plasmatiques : phosphatases alcalines, bilirubine, souvent les transaminases chez les patients. Le modèle de cholestase que nous souhaitons développer chez la souris se présente comme un des modèles les plus relevant de la pathologie humaine. Il s'agit de mettre les souris sous diète modifiée (hyper lipidique par exemple) pendant plusieurs jours à plusieurs semaines afin d'induire la pathologie. Le modèle mime l'accumulation d'acides biliaires observée chez les patients lors d'une cholestase.

Le traitement avec les molécules de la société aura lieu en traitement chronique quotidien concomitamment à l'instauration de la diète modifiée.

Ces souris vont donc présenter une pathologie évolutive qui passe par les mêmes stades d'évolution que chez l'homme à savoir une accumulation d'acides biliaires, une inflammation hépatique puis le développement d'une cholestase associée à un développement de fibrose hépatique. Ainsi les souris vont présenter des enzymes hépatiques élevées, une augmentation des Triglycérides et du cholestérol, une hypertrophie du foie, une diffusion de gras dans les tissus hépatiques (stéatose) ainsi que le développement d'une fibrose hépatique ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation des lipides dans le foie. L'ensemble de ces données collectées et analysées tout au long de l'expérience seront ainsi cliniquement transposables et permettront de prouver la valeur réelle des molécules testées. Les souris dans ce modèle de cholestase présentent donc exactement les mêmes symptômes que les patients. Nous regarderons donc l'effet de nos inhibiteurs sur l'ensemble de ces paramètres qui devraient être atténués de manière dose dépendante.

Dans chaque expérience nous testerons plusieurs conditions et nous inclurons 10 animaux par condition pour un total de 500 souris mâles sous cette demande d'autorisation : 8 molécules devront être testées à 3 doses, vs Sham (diète normale) et Contrôle (diète modifiée, traitement = véhicule), soit 5 groupes par expérience, 50 animaux/expérience = 400 animaux + 80 animaux pour l'étude pilote* + 20 pour le training**.

Nous réaliserons en effet au préalable une étude pilote pour déterminer la souche de souris (C57Bl/6 et/ou Db/Db) et la bonne diète à utiliser, le moment où la cholestase s'installe véritablement, étudier le dépôt de fibrose pour déterminer le bon jour de sacrifice des animaux, optimiser les chances d'observer des effets de composés. Elle permettra également d'étudier l'évolution de la pathologie.

*10 animaux par condition seront nécessaires à cette étude pilote, 80 animaux au total : Sham (diète normale 10 BL6 et 10 db/db), ou sous diète modifiée 8, 12 ou 16 semaines (10BL6 et 10 db/db à chaque point).

** l'arrivée de nouvelles personnes dans le groupe nécessite également l'apprentissage des techniques employées sur cette étude comme les gavages, les injections sc, ip, les prélèvements

sanguins terminaux et l'euthanasie, de ce fait nous utiliserons 20 souris mâles C57Bl/6 comme souris training.

Aujourd'hui aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* n'existe pour mimer suffisamment toutes les composantes de la fibrose hépatique à savoir à la fois la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes et le stress oxydant. Ces modèles ne peuvent pas non plus de façon satisfaisante prédire le comportement biologique *in vivo* d'un composé ou l'impact physiologique et l'efficacité d'un traitement donné. Cependant nous veillerons à ne tester que les molécules les plus avancées et les plus optimisées qui auront déjà démontrées des activités in-vitro performantes, une absence de toxicité cellulaire et des propriétés pharmacocinétiques permettant d'envisager raisonnablement une efficacité in-vivo. Il est prévu de tester 8 molécules sur un espace de deux années.

De plus, ce nombre de 10 animaux par groupe nous apportera le meilleur compromis entre le fait de ne pas trop utiliser d'animaux par groupe et le fait de générer des résultats avec une très bonne puissance statistique. La mesure de paramètres biochimiques comme les enzymes hépatiques nécessite en effet un nombre minimal de 10 animaux par groupe. Le test statistique qui sera utilisé sera le test de comparaison multiple de Bonferroni, le plus adapté pour comparer différents groupes et différentes conditions entre eux et démontrer une significativité sur des échantillons de petite taille (8 à 10 individus par groupe). Une p value de <0.05 sera considérée comme significative.

Le but de cette étude sera de démontrer :

- l'effet de notre composé par rapport aux différents groupes contrôles
- un effet pharmacologique dose proportionnel

Ce modèle est un modèle robuste et reproductible et qui est très représentatif des cas cliniques chez l'homme. Les résultats générés permettront ainsi d'envisager sereinement une transposition de l'activité attendue chez l'homme.

Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet.

Nous serons tout particulièrement vigilant au suivi clinique quotidien ainsi qu'au suivi hebdomadaire du poids corporel des animaux tout au long de l'expérience. Ainsi tout animal qui présente des signes de prostration ou de souffrance visible sera exclu de l'expérience et euthanasié.

Les animaux seront hébergés par 5 en cages jetables type Innovive et auront à leur disposition de l'eau et la diète à volonté. De l'enrichissement (dômes plastiques rouges pour les cacher et plaque de ouate) sera mis à leur disposition.

13216 L'objectif de ce projet consiste à évaluer les effets de l'alimentation (matières premières, additifs nutritionnels, programmes alimentaires, niveaux nutritionnels, ...) sur les performances zootechniques, et la santé des volailles dans les élevages.

D'une part, la génétique des volailles élevées évolue au cours des années, et les besoins nutritionnels et de santé des animaux changent. D'autre part, les attentes sociétales évoluent elles-aussi avec le souhait d'améliorer le bien-être des animaux, d'utiliser moins d'antibiotiques, de réduire l'impact de l'élevage sur l'environnement et d'améliorer la qualité de produits.

Pour répondre à ces objectifs, il est nécessaire de tester des programmes alimentaires, de nouvelles matières premières, de mettre au point de nouveaux additifs ou autres produits d'intérêts nutritionnels et de santé en évaluant leur impact sur les performances (croissance, santé) d'élevage des animaux ainsi que la qualité de la viande. L'analyse des fientes apportent des enseignements intéressants sur la valorisation par l'animal de ces solutions nutritionnelles.

Or, les évaluations de ces solutions nutritionnelles à partir d'analyses chimiques restent problématiques, et les techniques *in vitro* sont encore délicates à mettre en œuvre. De plus, elles demeurent imprécises quand on cumule l'incertitude des modèles de prédiction à celle associée à la variabilité analytique. Ainsi le seul recours est la mesure *in vivo*.

Pour ce faire, nous élevons des volailles chaque année pour réaliser les essais zootechniques. Ce bâtiment sera composé de 80 modules grillagés. Sur 5 ans, nous réaliserons 32 essais sur un total de 38400 poulets et 5 essais sur un total de 2400 dindes. Remplacement, compte tenu la question

scientifique de ce projet, il n'est pas possible de remplacer le modèle *in vivo* par une méthode alternative.

Les animaux sont élevés temporairement dans des compartiments grillagés. Un essai dure entre 28 et 42 jours pour les poulets, 105 jours pour les dindes.

Les volailles sont élevées en cage car ce système permet également de récupérer les excréta pour procéder aux mesures de digestibilité, grâce à des plateaux positionnés sous la cage, sans manipuler ni abattre des animaux. Ce système de cage permet, d'avoir des répétitions statistiques permettant des tests fiables avec un nombre limité d'animaux.

La durée d'élevage dans ces compartiments grillagés est réduite au minimum pour les besoins expérimentaux. Les poussins peuvent être démarrés dans un bâtiment au sol pendant 2 semaines avant d'intégrer leurs cages pour 2 à 3 semaines. A la fin des essais, les animaux sont élevés dans un autre bâtiment sur litière jusqu'à ce qu'ils atteignent leur poids de commercialisation. L'ambiance de la salle d'élevage est maîtrisée (ventilation, chauffage, brumisation). Les volailles ont un accès libre permanent à l'eau de boisson et à l'aliment. Leurs poids sont enregistrés de façon régulière au cours des essais et comparés aux courbes standard des sélectionneurs afin de vérifier que la croissance des volailles n'est pas altérée.

Des mailles plastiques sont posées sur le sol grillagé pendant les 1ers jours pour améliorer le confort. Une mangeoire supplémentaire est aussi ajoutée dans le compartiment.

13217 En réponse à une situation stressante, l'organisme se protège et se défend par la sécrétion de deux hormones produites par les glandes surrénales : l'adrénaline et le cortisol. Ces deux molécules sont produites dans des parties distinctes des surrénales : la partie externe pour le cortisol, et la partie interne pour l'adrénaline. De nombreuses études scientifiques menées chez des rongeurs de laboratoire ont démontré l'influence du microbiote intestinal (micro-organismes peuplant naturellement l'intestin animal et humain) sur la production de la corticostérone (équivalent du cortisol chez l'Homme). L'utilisation de modèles de rongeurs dépourvus de microbiote intestinal (dits rongeurs axéniques) a montré notamment que, lors d'exposition au stress, la corticostérone était beaucoup plus élevée chez les rongeurs axéniques que chez les rongeurs conventionnels (porteurs de leur microbiote intestinal naturel). Cependant, on ignore encore l'effet du microbiote sur la production de l'adrénaline et on ignore également les détails de l'influence du microbiote sur le fonctionnement des surrénales. Or cette connaissance est cruciale pour différentes raisons. D'une part l'exposition permanente au stress peut mener à des troubles de l'humeur, de la dépression ou des neuropathies ; d'autre part il est à présent reconnu qu'une dysbiose (modification durable de la composition du microbiote) peut contribuer à favoriser l'anxiété et la dépression chez les sujets vulnérables.

Le but de ce projet est donc de rechercher si le microbiote intestinal influence la quantité d'adrénaline produite lorsque l'organisme est exposé à un stress, et d'identifier quelles étapes métaboliques conduisant à la production de corticostérone et d'adrénaline dans les glandes surrénales sont influencées par le microbiote. Cette question ne peut être résolue par l'utilisation de modèles *in vitro*, et nécessite l'utilisation d'animaux de laboratoire. Nous exposerons des rats axéniques et conventionnels adultes soit à un stress chronique de 2 semaines (perturbations modérées et imprévisibles de la vie quotidienne telles que litière mouillée pendant une demi-journée ou privation de nourriture pendant une nuit), soit à un stress aigu d'une heure (immobilisation dans un tube entravant les mouvements de la tête et des pattes), soit à un stress chronique de 2 semaines suivi d'un stress aigu d'une heure. A la suite de ces stress, les rats seront euthanasiés et du sang, leurs glandes surrénales et leur cerveau seront prélevés pour analyses. Des rats axéniques et conventionnels non exposés aux stress serviront de groupes témoins.

Les deux protocoles de stress sont couramment utilisés dans notre laboratoire et nous avons constaté qu'ils induisent chez les animaux un stress modéré sans souffrance physique. Raffinement : l'état général des rats sera observé quotidiennement (état du pelage, comportement spontané et interactions avec le congénère hébergé dans la même cage) et leur poids corporel et leur consommation alimentaire seront mesurés deux fois par semaine pendant les 2 semaines

d'expérience. Nourriture et eau seront disponibles à volonté, avec des restrictions temporaires occasionnelles pour les rats exposés au stress chronique. Les rats seront hébergés à deux par cage, et un enrichissement de leur milieu de vie sous la forme de bâtonnets à ronger, de papier à déchiqueter et de tunnels ou abris en matière plastique sera pratiqué.

Réduction : des expériences précédentes et d'autres rapportées dans la littérature scientifique suggèrent qu'un effectif de 8 rats par groupe est nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats et les exploiter. Quatre groupes de rats axéniques (témoin, stress chronique, stress aigu, stress chronique puis aigu) et 4 groupes de rats conventionnels (témoin, stress chronique, stress aigu, stress chronique puis aigu) seront utilisés, soit un nombre total de rats de 64. Pour des raisons pratiques, l'expérience sera organisée en deux séries successives identiques utilisant 32 rats. Pour tenir compte du fait qu'une contamination bactérienne accidentelle des rats axéniques pourrait se produire, ce qui nécessiterait d'arrêter la série expérimentale, nous prévoyons un effectif supplémentaire de 32 rats permettant de recommencer une série. Le nombre total maximum de rats utilisés sera donc de 96.

13218 Le cancer pancréatique est un des cancers les plus agressifs. Le taux de survie globale à 5 ans est inférieur à 3%, et la plupart des patients atteints de cancer du pancréas décèdent dans les 6 mois suivant le diagnostic. Ce mauvais pronostic s'explique par l'incapacité de diagnostiquer ce cancer à un stade précoce ; en effet dès l'apparition des symptômes la tumeur est à un stade déjà très avancée et souvent métastatique. De plus, les patients ne répondent que très peu à la plupart des chimiothérapies et s'avèrent donc être résistants aux traitements utilisés en clinique à l'heure actuelle.

Si la grande majorité des études se sont penchées sur le comportement des cellules tumorales ce n'est que très récemment qu'un potentiel rôle du microenvironnement a été suggéré. Le microenvironnement ou stroma est constitué de plusieurs types cellulaires non tumoraux tels que les cellules immunitaires ou les fibroblastes. Or, il se trouve que dans la plupart des tumeurs solides (prostate, sein) il est dorénavant admis que ce microenvironnement participe au développement de la tumorigénèse.

Dans le cancer pancréatique le stroma dense et peu vascularisé constitue une véritable forteresse pour les cellules cancéreuses. En limitant l'afflux sanguin à la tumeur, le stroma influe sur l'agressivité, l'adaptation aux conditions métaboliques restreintes, et la résistance aux chimiothérapies des cellules tumorales. Situés à l'interface entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral, les canaux ioniques sont des acteurs clefs du dialogue entre les cellules cancéreuses et le stroma : la compréhension des mécanismes qui gouvernent leurs fonctions dans les adénocarcinomes pancréatiques est essentielle pour la mise au point de traitements innovants ciblant une destruction du stroma pour favoriser l'accès des chimiothérapies.

Sig1R est une protéine chaperon activée par le stress (hypoxie) a été caractérisée comme un régulateur de l'expression des canaux ioniques dans les leucémies et les cancers du sein.

L'analyse d'une cohorte de 100 patients d'adénocarcinomes pancréatiques montre la surexpression de Sig1R dans les cellules tumorales et dans les zones hypoxiques du stroma comparé à un pancréas sain. Les données suggèrent que Sig1R régule les canaux et transporteurs clefs du dialogue stroma/cellules tumorales dans le cancer pancréatique.

L'objectif de ce projet est donc de caractériser *in vivo* dans les adénocarcinomes pancréatiques le rôle de Sig1R et des canaux ioniques associés, et d'évaluer le potentiel thérapeutique de petites molécules altérant spécifiquement l'activité de Sig1R (ligands sigma) pour réduire l'agressivité et restaurer la sensibilité aux traitements (Gemcitabine) en déstructurant le stroma.

Ce projet est composé de quatre procédures expérimentales, la première consiste en l'étude de l'impact de l'inactivation moléculaire de Sig1R sur des greffes murines sous cutanées ; la deuxième est l'étude de l'impact de l'inactivation pharmacologique sur des greffes murines sous cutanées, en combinaison avec la Gemcitabine. La troisième procédure consiste en l'étude de l'impact de l'inactivation de Sig1R dans le compartiment stromal et/ou tumoral sur la tumorigénèse pancréatique et le développement de métastases sur des xéngreffes humaines orthotopiques.

Enfin la dernière consiste à étudier l'impact de l'inactivation pharmacologique de Sig1R dans un modèle endogène murin de cancer du pancréas.

La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation d'un total de 110 animaux. Les concepteurs et expérimentateurs s'engagent à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant la réalisation de statistiques et l'extraction de résultats fiables et robustes qui serviront les avancées scientifiques de demain. Afin de respecter la règle des 3 R, nous avons, pour l'ensemble de ces procédures, évaluer les possibilités de remplacement, mis en place un suivi journalier des animaux, une prise en charge spécifique de la douleur lors des chirurgies et en suivi post-chirurgical mais également lors du suivi quotidien des souris si nécessaires. De plus, un enrichissement renouvelé toutes les semaines incluant 3 enrichissements différents sur des cycles de trois semaines est en place dans l'animalerie et le nombre d'animaux a été calculé par des tests statistiques permettant de réduire à minima le nombre d'animaux utilisé par ces procédures.

13219 L'hypermétabolisme est observé dans plus de la moitié des patients atteints de cancer et constitue un facteur de mauvais pronostic, associé au risque de toxicité thérapeutique, de moindre efficacité des immunothérapies et de cachexie. L'hypermétabolisme, défini comme une augmentation de plus de 10% de la dépense énergétique de repos, peut être facilement détecté de façon non invasive par calorimétrie indirecte. Si ses conséquences ont été bien étudiées, la physiopathologie de l'hypermétabolisme reste largement méconnue. L'objectif de ce projet est donc d'identifier les causes de l'hypermétabolisme associé au cancer, et notamment d'évaluer les contributions respectives du métabolisme spécifique des cellules tumorales, de la réaction inflammatoire et de la dysbiose intestinale, ainsi que leur impact sur le métabolisme glucidique. Des modèles de cancers pulmonaires non à petites cellules orthotopiques ou de cancers sous-cutanés (cancers mammaires, sarcome ou cancer colorectal) seront induits par des cellules de cancers qui diffèrent par leur métabolisme énergétique, injectées successivement à des souris immunocompétentes, immunodéficientes et des souris soumises à une stérilisation digestive par antibiothérapie, pour tester ces 3 hypothèses non exclusives. La mesure de la dépense énergétique de repos sera mesurée par calorimétrie indirecte, dans des cages couplées à des analyseurs de gaz. La composition corporelle sera analysée par RMN. La croissance tumorale sera mesurée soit par bioluminescence soit à l'aide d'un pied à coulisse pour les cancers orthotopiques ou sous-cutanés respectivement. Ces procédures expérimentales sont prévues pour suivre les animaux de manière non invasive. Des analyses quantitatives et fonctionnelles sanguines, fécales et histologiques permettront, le cas échéant, d'évaluer le syndrome inflammatoire, l'activation du système immunitaire, la dysbiose intestinale et les conséquences sur le métabolisme du glucose. Selon les mécanismes identifiés, des interventions thérapeutiques ciblées pourront être évaluées (traitements anti-inflammatoires pour limiter l'inflammation systémique, régimes diététiques ou transplantation fécale pour modifier le microbiote...). Ce projet, d'une durée de 4 ans, impliquera l'utilisation au maximum de 660 souris. Les animaux sont nécessaires à la compréhension des mécanismes et des phénomènes qui sont observés chez l'Homme sain et malade. Cette étude peut être conduite uniquement *in vivo* car il n'y a pas d'autres modèles pour pouvoir étudier l'hypermétabolisme qui se définit par une augmentation anormale du taux de métabolisme basal de l'organisme entier, évalué par la dépense énergétique au repos et par la mesure de la composition corporelle selon les techniques employées chez l'homme. Pour respecter le principe des 3R, les premiers résultats permettront d'optimiser et de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour chaque groupe. Les critères de jugement principaux seront obtenus par les techniques non invasives décrites ci-dessus. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Le suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Les résultats de ce travail doivent permettre de mieux comprendre les

mécanismes impliqués dans l'hypermétabolisme associé au cancer, et d'identifier d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques pour optimiser la prise en charge du cancer.

13220 Ce projet innovant vise à mieux comprendre la pathologie de la maladie d'Alzheimer. Celle-ci est caractérisée par la présence dans le cerveau des malades de nombreuses plaques amyloïdes dont le mode d'apparition et le rôle dans la pathologie sont débattus. La protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) a été identifiée, comme son nom l'indique, comme la source du peptide qui compose les plaques amyloïdes mais son rôle direct dans la maladie et le mécanisme menant à l'apparition des plaques sont mal connus.

Nous avons récemment observé que l'APP s'accumule autour des plaques amyloïdes. Nous souhaitons étudier le lien temporel entre ces accumulations d'APP et l'apparition de plaques amyloïdes.

Ce projet permettra de tester cette hypothèse et donc de mieux comprendre la maladie et à terme d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La réalisation du projet est basée sur la modification génétique des neurones étudiés dans leur tissu natif (cerveau de souris), c'est-à-dire dans un contexte physiologique. Nous exprimerons le gène encodant la protéine APP fusionnée à une autre protéine fluorescente afin de suivre son devenir dans les neurones. Cette modification génétique sera réalisée grâce à l'utilisation de séquences d'ADN injectées dans les neurones du cerveau. Ces injections cérébrales auront lieu sur souris sous anesthésie et analgésie. Cette procédure sera suivie de la pose d'une fenêtre en verre (fenêtre crânienne) permettant la visualisation par fluorescence des neurones et des plaques amyloïdes au cours d'expériences de vidéo-microscopie.

Au total, 60 souris seront utilisées dans notre projet. Pour le respect de la règle des 3R, (1) la solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (imagerie chronique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux. (2) Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès le réveil de l'animal et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. (3) Les modèles de remplacement *in vitro* actuellement disponibles ne récapitulent pas les aspects neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer et ne permettent pas d'étudier fidèlement les mécanismes neurodégénératifs.

13221 Les protocoles de greffe de cellules de moelle osseuse (MO) sont couramment utilisés pour traiter les maladies immunes et du sang. Ces techniques sont également largement utilisées pour évaluer les fonctions des cellules souches du sang présentes dans la MO en recherche fondamentale. Au cours de ces greffes, les individus receveurs subissent préalablement un traitement myéloablatif (destruction de la MO) soit par irradiation létale (rayons X ou gamma) ou par chimiothérapie.

Récemment, des travaux chez la souris ont montré que la destruction ciblée des cellules souches de la MO permet une greffe rapide et efficace des cellules de MO. De manière avantageuse, cette destruction ciblée permet également de conserver l'ensemble des cellules sanguines et immunitaires assurant une réponse efficace de l'hôte contre les pathogènes.

Notre laboratoire s'intéresse à une famille des facteurs régulant la fonction des cellules souches du sang. Dans le but d'évaluer la fonction de ces cellules nous effectuerons des greffes de MO. En absence d'instrumentation permettant d'effectuer une irradiation myéloablative, nous allons mettre en place une nouvelle technique de destruction ciblée de la MO présentant des effets secondaires réduits tel que les risques infectieux liées à l'immunodéficiences et améliore le bien-être des animaux. Pour cela dans un premier temps, nous injecterons dans la veine une solution permettant la destruction ciblée de la MO. 8 jours après l'injection, les souris seront greffées avec des cellules

de la MO par une injection dans la veine afin de réduire les risques d'anémie pouvant survenir 10 jours après destruction de la MO. Puis, la prise de greffe sera évaluée par le prélèvement de quelques gouttes de sang à la queue des souris à raison d'une prise de sang tous les mois.

Afin de respecter la règle des 3R :

Une Réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée. Pour répondre à cet objectif, et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (Student t-test), nous prévoyons d'analyser des groupes de 5 souris/ conditions, soit 33 souris pour le projet global.

Pour répondre à l'objectif de Raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux), et dans des cages comportant des enrichissements (nids). Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites.

La règle du Remplacement n'est pas applicable ici : en effet, nous devons avoir recours à un modèle *in vivo* afin d'étudier la destruction des cellules dans la MO ainsi que la prise de greffe de cellules de MO dans un individu. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à des modèles *in vitro*. En ce qui concerne les modèles *in vivo*, la souris est un modèle de choix pour l'analyse génétique et les expériences de transplantation de MO.

13222 Ce projet aura pour but d'étudier, sur un modèle préclinique, les troubles psychiques tardifs survenant à la suite d'un traumatisme crânien (TC), en particulier l'anxiété et la mémoire dans l'état de stress post-traumatique (ESPT). La prévalence de l'ESPT dans la population TC est importante, et l'un des symptômes majeurs de cette maladie est l'incapacité à éteindre les mémoires de peur.

Le trauma crânien et l'état de stress post traumatique sont des maladies complexes dont les symptômes neurobiologiques et comportementaux ne peuvent être étudiés qu'avec l'animal.

L'objectif du projet sera d'induire un TC chez la souris et d'évaluer les déficits comportementaux de type EPST survenant au long terme (des semaines plus tard), en relation avec différents facteurs de croissance (facteurs trophiques ; dans le sang, le cerveau et le foie) qui permettent les phénomènes de réparation du cerveau à la suite d'un trauma. Le TC sera induit expérimentalement, puis l'EPST sera modélisé par le modèle Pavlovien du conditionnement de la peur. Des tests comportementaux seront également réalisés afin d'évaluer l'état d'anxiété des animaux, ainsi que leur mémoire spatiale et leur flexibilité cognitive. Après 10 semaines, les souris seront euthanasiées afin de prélever des échantillons sanguins et les organes d'intérêt. Les études seront réalisées sur 225 souris.

Le modèle de TC expérimental, sous anesthésie générale et avec administration d'un antalgique, sera induit grâce à un appareil contrôlé par ordinateur, permettant de limiter l'étendue de la blessure cérébrale. Ce modèle expérimental est donc très reproductible et entraîne rarement une mortalité, réduisant le nombre d'animaux nécessaires. De plus, nous utiliserons le modèle de la peur conditionnée, des semaines après le TC, pour modéliser l'incapacité à éteindre les mémoires de peur car celui-ci est très pertinent, robuste et réduit le nombre d'animaux nécessaires. Finalement, concernant le remplacement, les facteurs trophiques qui seront étudiés ont été sélectionnés sur la base d'études réalisées suggérant leur implication dans la pathologie chez l'homme.

Afin de respecter les 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire pour l'analyse statistique. Une prise en charge de la douleur suite au TC, permettra de limiter au maximum la souffrance, et le comportement des animaux sera observé quotidiennement afin d'éviter la souffrance. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les prélèvements sanguins et la perfusion intracardiaque par une solution saline seront effectués sous anesthésie générale et avec administration d'un antalgique. Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet.

Nos objectifs seront d'identifier des marqueurs prédictifs du devenir pathologique de patients atteints d'un TC ou ayant vécu un événement traumatisant. A terme, il s'agira de développer des stratégies pharmacologiques pour la prise en charge des séquelles physiques et psychiatrique post-TC. Ce

projet s'inscrit dans une thématique plus large de notre laboratoire, qui évalue l'intérêt des stratégies thérapeutiques neuroprotectrices, et favorisant la neuroréparation suite au trauma crânien.

13223 L'acide rétinoïque (ATRA) est essentiel car c'est une vitamine. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que l'ATRA contrôle pour exercer ses effets. La gamétogenèse est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en ATRA.

La gamétogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires de la gonade, dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système *in vitro* (1er R de la règle des 3R) est impossible.

Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Au cours de ce projet, une lignée de souris génétiquement modifiée sera utilisée (lignée de souris mutante pour les gènes codants pour les récepteurs de l'ATRA). Dans cette lignée de souris, les souris mutantes ne survivent pas à la naissance. Ceci empêche notre étude sur la fertilité des femelles mutantes. Les protocoles mis en œuvre dans ce projet permettent de greffer, dans des femelles receveuses, les ovaires des souris mutantes afin d'étudier la fonctionnalité des cellules germinales produites.

Le nombre d'animaux requis est de 12 souris au maximum. Ces nombres sont calculés au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Chaque groupe d'animaux ne fera l'objet que d'une seule procédure et, le cas échéant, la procédure sera réalisée sous anesthésie générale avec les anti-douleurs adaptés et du gel oculaire. Le suivi post-opératoire sera assuré avec un maintien sur plaque chauffante et une surveillance jusqu'à récupération totale des animaux. Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

13224 La stratégie de recherche sur les maladies neurodégénératives (MNDs), dont les plus communes sont les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, est une priorité sociétale et présente différents buts (améliorer le diagnostic, la qualité de vie, la prise en charge et développer la recherche fondamentale et appliquée).

Notre objectif principal est de retarder ou d'enrayer la progression clinique de ces maladies en empêchant ou en inversant les mécanismes physiopathologiques de dépôts diffus ou localisés (exemple dépôts amyloïdes) imputés aux lésions du système nerveux central. Nous avons développé une approche thérapeutique nouvelle pour extraire de manière sélective des métaux participant à la composition de ces dépôts considérés comme toxiques en rétablissant l'homéostasie métallique (via dialyse et microdialyse).

En amont du développement pré-clinique de notre étude et afin de respecter la règle des « 3 R », nous avons choisi plusieurs méthodes alternatives (physico-chimiques et *in vitro*) pour optimiser de manière exhaustive les différents paramètres intervenant dans notre protocole. Cette étape essentielle nous permet à la fois de REMPLACER le modèle animal et aussi de REDUIRE au minimum leur nombre pour la démonstration de la faisabilité de notre projet en pré-clinique. Notre projet nécessitera 42 moutons maximum sur une durée de 5 ans. En effet, il est maintenant nécessaire de travailler sur un modèle de gros animaux pour envisager la mise en application clinique chez l'Homme. Dans un souci de RAFFINEMENT, chaque procédure chirurgicale pouvant impliquer un stress ou une douleur sera réalisée sous anesthésie. Un protocole analgésique adapté sera mis en place. De plus, chaque animal sera pris en charge et suivi de manière quotidienne et individuelle afin d'évaluer son bien-être (expertise de vétérinaires et de professionnels en santé animale).

Toutes les compétences seront mises en œuvre pour limiter le stress et la douleur des animaux au cours de ces tests. Tous les animaux seront hébergés dans le respect de leurs besoins éthologiques, avec mise en place d'enrichissements du milieu (bloc de sel pur à lécher, foin de bonne qualité à volonté). Des points limites, suffisamment prédictifs, seront mis en place afin de limiter au maximum la souffrance et ainsi anticiper l'arrêt de la procédure pour un animal donné.

13225 Les cellules dendritiques sont des cellules hématopoïétiques qui jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires. Ces cellules ont la capacité de présenter des antigènes qui sont des substances étrangères à l'organisme capables de déclencher une réponse immunitaire visant à les éliminer. La présentation antigénique initie donc une réponse immunitaire adaptative qui permet par exemple l'élimination des cellules tumorales ou infectées par un virus, exprimant cet antigène.

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes moléculaires qui régulent la présentation antigénique dans les cellules dendritiques. Nos travaux ont montré dans un système cellulaire que l'absence d'expression d'un moteur moléculaire (kinésine-1) induit un défaut de présentation antigénique. Afin de confirmer ces résultats dans un système physiologique, notre projet a pour but d'étudier un modèle de réponse anti-tumorale en utilisant des souris déficientes pour l'expression de ce moteur moléculaire. En effet, l'étude de la réponse anti-tumorale fait appel à de nombreux paramètres qui ne peuvent pas être restreints à un modèle cellulaire.

L'objectif de notre projet est de comprendre le rôle de notre molécule (kinésine-1) dans ce processus de réponse anti-tumorale. Des souris contrôles et déficientes pour notre molécule seront injectées avec une lignée tumorale (mélanome B16 exprimant l'antigène OVA) puis des lymphocytes T (LT) spécifiques de cet antigène seront injectés. Une présentation antigénique efficace permettra de faire diminuer la taille de la tumeur. Notre hypothèse est qu'en absence d'une présentation efficace dans le modèle murin déficient pour la kinésine-1, la lignée tumorale ne pourra pas être éliminée avec la même cinétique que pour les souris contrôles. Ce travail permettra de démontrer *in vivo* le rôle de cette molécule dans la régulation du processus de présentation antigénique par les cellules dendritiques, et dans la réponse anti-tumorale.

Ce projet a été développé en respectant la règle des 3R. Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet. Des points limites sont identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentielle des animaux. La mise à mort des souris sera réalisée sous anesthésie générale. Le nombre de souris utilisées dans cette étude sera restreint au minimum requis pour obtenir des résultats interprétables et significatifs. Cette étude nécessitera 80 souris sur une période de 2 ans.

13226 Notre société développe des colles chirurgicales biocompatibles, biodégradables et flexibles qui peuvent avoir différentes applications cliniques. Notre premier produit est un sealant vasculaire qui a prouvé son efficacité en complément de sutures dans des chirurgies de reconstruction vasculaire au cours d'une étude clinique. Après avoir effectué une caractérisation chimique et une évaluation des performances *ex vivo* de notre polymère, et ce projet nous permettra d'effectuer une validation *in vivo*. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de 3 formulations de notre polymère en tant qu'adhésifs pour la fixation de plaques dans des procédures de réparation d'hernies abdominales. Il existe plusieurs modèles animaux qui permettent d'évaluer l'efficacité des méthodes de fixation, nous avons choisi le rat connu pour sa pertinence dans la littérature. Plusieurs groupes de rats seront utilisés et évalués dans le cadre des procédures expérimentales. Il s'agira de procédures expérimentales classiques, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 240 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) Réduction : le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé au maximum tenant compte, quand applicable, des analyses statistiques qui seront effectuées ; 2) Raffinement : une pré-sélection des produits testés sera effectuée avant les études et les procédures décrites prennent en compte des temps de récupération et un nombre d'essais visant à réduire le stress, la fatigue et la souffrance des animaux ; 3) Remplacement : quand cela sera possible nous effectuerons des études *ex vivo*, utilisant des organes d'animaux sacrifiés dans un autre contexte (autres études, abats de boucherie, etc.). Cependant, les études *in vitro* et sur

animaux invertébrés ne peuvent pas être envisagées car ces modèles ne permettent pas de mimer les propriétés biologiques et mécaniques des organes entiers. Les animaux seront anesthésiés pour diminuer la souffrance animale. Pendant les procédures chirurgicales mentionnés les traitement analgésiques et anesthésiques seront administrés pour éviter de la souffrance pour les animaux. Pendant les périodes post-chirurgicales, un suivie attentif des animaux sera effectué et des analgésiques seront administrés si besoin.

13227 Au cours de la maladie d'Alzheimer (MA), différentes protéines s'accumulent de façon anormale dans le cerveau des patients. Ces protéines pourraient transmettre leurs caractères pathologiques (« mauvaise conformation » et toxicité) aux protéines bien conformées et présentes naturellement dans les tissus. Ce phénomène de propagation évoque celui à l'œuvre dans les maladies à prions (maladie de la vache folle, maladie de Creutzfeldt-Jakob). Notre projet vise à étudier les mécanismes de ce phénomène en répondant à deux questions principales :

1) Les lésions de la maladie d'Alzheimer se propagent-elles le long des connexions nerveuses (appelées axones) ?

Nous étudierons la propagation des lésions, chez l'animal (souris) dans un circuit anatomique bien délimité reliant deux structures cérébrales (le subiculum et les corps mamillaires) via un faisceau de fibres axonales (le fornix). Nous utiliserons à nouveau un paradigme d'infusion intracérébrale. Des souris recevront des injections de fornix provenant de patients Alzheimer. Les injections seront réalisées dans le subiculum et on étudiera la présence et transport des agrégats pathologiques dans le fornix et dans les corps mamillaires. L'analyse des résultats permettra d'affiner notre connaissance des mécanismes de propagations des lésions.

2) Existe-t-il différentes souches de la maladie d'Alzheimer ?

La maladie d'Alzheimer est une maladie hétérogène : d'un patient à l'autre les symptômes varient, s'aggravent plus ou moins vite et parfois l'évolution est fatale en un an. On peut suspecter l'existence de différentes souches de la maladie que nous allons isoler et étudier. Nous évaluerons la capacité de tissus cérébraux de patients avec des formes distinctes de la maladie à induire, une fois injectés chez l'animal (souris), des lésions et des symptômes précis, attestant de l'existence de différentes souches. Ce travail vise à mieux comprendre l'hétérogénéité de la maladie d'Alzheimer. En particulier, pourquoi certains patients déclenchent une maladie relativement jeune avec une évolution rapide alors que d'autres patients s'aggravent plus lentement ? La compréhension des mécanismes responsables de la vitesse d'évolution permettra des approches thérapeutiques « ciblées » qui prennent en compte la diversité des patients. On sait en effet que différentes souches responsables d'une maladie peuvent répondre de façon variable aux traitements ciblant les lésions. Ainsi, au-delà des connaissances fondamentales apportées sur la maladie d'Alzheimer, notre projet aura des prolongements dans les domaines de la thérapeutique et de la santé publique.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 616 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données reproductibles et donc solides ; 2) raffinement, les animaux seront soumis à une chirurgie unique sous anesthésie générale au cours de la période d'expérimentation. La chirurgie est effectuée en analgésie et ne s'accompagne pas d'effets secondaires dommageables. Les paramètres vitaux des animaux sont contrôlés tout au long de la procédure. Le réveil des animaux est surveillé et une dose d'antalgique est administrée aux animaux afin de réduire la souffrance post-opératoire ; 3) remplacement, les études de propagation permettant de répondre aux questions posées ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques, mimant à bas bruit les lésions de la maladie d'Alzheimer (souris transgéniques APP et tau) et chez lesquelles les effets des différents injectas pourront être étudiés.

13228 La prévalence de l'obésité est en constante augmentation au niveau mondial et d'intenses recherches sont menées pour en comprendre les causes et trouver les traitements adaptés. L'obésité résulte d'un déséquilibre entre les apports (alimentation) et les dépenses (exercice physique) d'énergie. Une des complications majeures dans l'obésité est l'apparition d'un diabète de type 2 qui conduit à un taux de glucose dans le sang (glycémie) trop important ou hyperglycémie

chronique par absence de réponse adéquate à l'insuline, une hormone qui diminue la glycémie. Le GLP-1 (pour glucagon-like peptide-1) est une incréline, une hormone intestinale qui stimule la sécrétion d'insuline pancréatique lorsque la glycémie est élevée, après un repas notamment. Les analogues du GLP-1 sont commercialisés afin d'aider les patients diabétiques à réguler leur glycémie. Cependant, malgré les nombreux effets avérés de ces molécules pharmacologiques, leurs mécanismes d'action sur le cerveau sont très mal connus.

Le bulbe olfactif (BO) est une structure cérébrale qui permet de donner des indications sensorielles sur la toxicité ou l'aspect agréable des aliments : un mauvais fonctionnement du BO a été décrit chez dans l'obésité chez l'homme. Nous avons montré le système GLP-1 dans le BO permet d'améliorer la glycémie de souris rendues obèses par une alimentation hypercalorique en augmentant les quantités d'insuline dans le sang. Il s'agit donc d'un effet protecteur très prometteur et intéressant à étudier.

Dans ce projet, nous voulons identifier les mécanismes à l'origine de l'augmentation d'insuline plasmatique induite par l'activation de la voie GLP-1 dans le BO. Dans ce but, nous voulons empêcher le fonctionnement du système GLP-1 dans le BO et observer les effets sur la glycémie et les niveaux circulants d'hormones du métabolisme énergétique. Ces expériences seront rendues possibles par l'utilisation d'outils génétiques appropriées.

Dans ce projet, nous veillerons à réduire le nombre de souris et à raffiner (améliorer) leurs conditions d'expérimentation.

>Pour procéder à nos expériences, et en nous limitant à un panel statistiquement représentatif, nous aurons besoin de 240 souris.

>Cette étude qui s'effectuera sur 3 ans ne peut se faire sur une autre espèce que la souris : par exemple, chez les invertébrés, il n'existe pas de pancréas ni de GLP-1. De plus, nous ne pouvons pas réaliser ces expériences *in vitro* ou sur cultures de cellules puisque pour notre étude nous avons besoin d'étudier des paramètres sanguins.

>Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé: notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins pré-, per- et postopératoires adéquats, à recourir à l'anesthésie et à l'analgésie, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

13229 Le développement de médicaments pour le traitement des maladies du système nerveux central constitue un challenge majeur (peu ou pas de nouvelles molécules sur le marché depuis 40 ans dû aux échecs répétés des différents essais thérapeutiques dans ce domaine). Ceci a été décrit comme étant dû au manque de prédictivité des modèles animaux qui reposent essentiellement sur une analyse comportementale.

La mesure électroencéphalographique (EEG) permet d'évaluer l'activité bioélectrique des neurones situés dans le voisinage de l'électrode de mesure. Cette activité peut être mesurée au repos ou lors de stimulations.

Des perturbations/modifications de la réponse électrophysiologique des neurones ont été rapportées dans différentes pathologies neuropsychiatriques/neurologiques, après administration de drogues, lors de l'activation de certains circuits neuronaux ou encore lors de modification de l'état physiologique (e. g. veille/sommeil). La mesure EEG permet également d'évaluer l'activité synchronisée de différentes structures cérébrales en réponse à un stimulus et/ou administration de drogues.

L'EEG repose sur la mesure d'un phénomène biologique bien conservé dans l'évolution des espèces (réponse électrophysiologique des neurones). De ce fait, cette technique bénéficie d'une valeur translationnelle très forte (puisque l'on peut mesurer l'EEG chez l'Homme tout comme chez l'animal) et donc apparaît comme un outil puissant dans le cadre de l'évaluation pharmacologique de candidat-médicaments. La communauté scientifique reconnaît le potentiel de l'EEG pour améliorer la translation des résultats obtenus chez l'animal vers l'Homme.

Ce projet a pour but d'évaluer l'effet de candidat-médicaments sur l'activité EEG. Cette analyse pourra éventuellement être complétée par des tests comportementaux. Il s'inscrit dans le développement de modèles précliniques plus fiables permettant de répondre au challenge du développement de médicaments pour les maladies du cerveau.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1600 rats et 1600 souris sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R: remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat et la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur l'électroencéphalogramme et le comportement. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat et la souris sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- le suivi de signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux
- un dispositif de télémétrie moins contraignant pour l'animal car système sans fil.

13230 Les maladies du foie, de causes très variées (alcool, virus, excès de gras, auto-immunes, biliaires etc.) sont un enjeu majeur de santé publique. Notamment, la stéatose (« foie gras ») touche 25% de la population. La stéatohépatite, stade symptomatique de la maladie, a un coût d'environ 30000 euros/an/patient et représenterait un marché pharmaceutique de plus de 25 milliards de dollars d'ici à 2026 aux Etats-Unis (première cause de greffe hépatique), en Europe occidentale et au Japon, avec une croissance annuelle moyenne de 45% par an. Son stade avancé, la cirrhose est la 14ème cause de mort dans le monde. Les maladies chroniques du foie conduisent à l'hépatocarcinome, 3ème cause mondiale de décès par cancer. La greffe du foie est l'unique solution durable mais pour un petit nombre de cas seulement (2,4 candidats pour un greffon, coût env. 150 000 euros, en France).

Les premières études en médecine régénérative du foie ont exploré la transplantation de cellules matures / différenciées dans le foie à réparer. Même si les premiers essais cliniques ont montré une certaine efficacité thérapeutique, elle reste insuffisante dans la plupart des situations. Les échecs sont principalement dûs à la non survie des cellules implantées.

Pour cette raison, la recherche se tourne maintenant vers la construction d'architectures plus complexes de cellules hépatiques maintenues vivantes dans des biomatériaux 3D. Même si un nombre croissant de petites et moyennes entreprises pratiquent la médecine régénérative, cela reste minoritaire en France. Le marché mondial de l'ingénierie des organes est estimé à plus de 5 milliards d'euros d'ici 2020.

L'objectif de cette étude est d'évaluer pré-cliniquement l'activité thérapeutique d'organoïdes encapsulés dans des biomatériaux développés au laboratoire dans un contexte d'atteinte hépatique aiguë. Ces biomatériaux sont brevetés, d'origine naturelle et biocompatibles.

Notre étude a 2 objectifs principaux :

- Déterminer le devenir de ces biomatériaux cellularisés (viabilité, fonctionnalité, biocompatibilité, biodégradation, infiltration cellulaire par les cellules de l'hôte etc.),
- Analyser leurs rôles dans la régénération du foie après une atteinte (exemples : suivi de la résorption de la lésion et de l'inflammation).

La régénération du foie repose sur de multiples interactions entre les processus de régénération, d'inflammation, de vascularisation et de cicatrisation impliquant le support des autres organes du corps et n'est pas modélisable *in vitro*. Ainsi pour développer un foie transplantable cliniquement, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Les biomatériaux cellularisés seront insérés dans ou sur les foies des souris, ou sous la capsule rénale par du personnel compétent.

Nous respecterons la règle des 3R. Il n'existe pas de méthode alternative pour remplacer l'expérimentation animale. Parmi les modèles de régénération du foie qu'on retrouve principalement dans la littérature et étant proches de la clinique, l'intoxication aigüe à l'acétaminophène chez la souris est le plus pertinent. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Dans l'esprit du raffinement de la règle des 3 R, les mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours de l'implantation et du modèle de régénération du foie. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles dans un environnement enrichi favorisant les comportements exploratoires et réduisant le stress. Les animaux seront hébergés dans une pièce où les paramètres environnementaux (température, hygrométrie, lumière) et sanitaires sont contrôlés. Un suivi du bien-être des animaux sera fait par un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours aux analgésiques si nécessaire et par la mise en place de points limites très précoces afin de limiter la douleur animale.

Pour réaliser cette étude nous avons tenu compte du nombre d'animaux à évaluer de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%), et des risques liés aux procédures : le nombre d'animaux utilisés pour la période du projet a été évalué à 832 souris maximum sur 5 ans. S'il y a moins de pertes que prévu lors des procédures, les animaux supplémentaires ne seront pas commandés. L'ensemble des animaux sera sacrifié à la fin de l'expérience.

13231 Les carcinomes digestifs tel que le carcinome hépatocellulaire voit leur incidence augmenter d'années en années. 5ème cancer en incidence dans le monde, le carcinome hépatocellulaire est un cancer primitif du foie qui peut métastaser dans le foie mais aussi dans des sites extrahépatiques pour un tiers des patients, dans le poumon majoritairement, ainsi que l'os, les ganglions lymphatiques, les surrénales.

Lorsque la résection chirurgicale d'une tumeur hépatique (primitive ou métastase) n'est pas recommandée, des traitements palliatifs doivent être mis en place, notamment ceux faisant appel à la radiologie interventionnelle. Par exemple, la chimio-embolisation intra-artérielle (administration d'une chimiothérapie directement au sein de la tumeur, dans du Lipiodol®), couplée à l'occlusion des artères nourricières du nodule permet d'intervenir *in situ* pour traiter une tumeur intra-hépatique.

En parallèle, un autre type de traitement de ces cancers s'est particulièrement développé ces dernières années : l'immunothérapie. Les agents d'immunothérapies permettent d'accroître nettement l'action des cellules immunitaires qui naturellement reconnaissent les cellules tumorales et cherchent à les détruire. Certaines thérapies existent aujourd'hui sur le marché pour des indications de carcinomes digestifs (le nivolumab et le pembrolizumab notamment), mais trop peu de patients y répondent (15 à 20%) et avec des effets secondaires multiples et encore mal connus.

Cependant, cette capacité à stimuler le système immunitaire peut présenter un intérêt supplémentaire lorsque les immunothérapies systémiques sont combinées avec une approche mini-invasive réalisée par radiologie interventionnelle. Ces dernières techniques (chimioembolisation, ablation...) peuvent induire une modification du microenvironnement tumoral, c'est-à-dire de la concentration et du type des cellules immunitaires présentes au niveau de la tumeur. La combinaison de ces deux types de traitements pourrait conduire à un effet synergique induisant une destruction plus efficace et rapide du nodule traité, ou encore à un effet dit abscopal (c'est-à-dire de la destruction à distance d'une métastase). En effet, il a été démontré qu'en combinant ablation par radiofréquence et immunothérapie systémique pour traiter un nodule tumoral, il était possible de traiter aussi des tumeurs à distance. Il semble donc intéressant de rechercher l'existence d'un tel effet suite à des traitements combinés par chimioembolisation et immunothérapies systémiques, dans le cadre de carcinomes avec un nodule hépatique ainsi que de déterminer quelle combinaison

est la plus efficace, avec la meilleure tolérance possible. Le projet proposé s'attachera donc à étudier de façon rigoureuse les conditions les plus favorables de cette association, en termes d'efficacité clinique et de tolérance.

Notre espèce de choix est le Rat, très décrit en littérature, sur lequel plusieurs modèles de tumeurs hépatiques ont été mis au point. Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet. Le projet complet nécessitera l'utilisation de 416 à 560 animaux. Le nombre d'animaux par lot dépendra des résultats des études préliminaires de mise au point et tiendra compte de la puissance statistique nécessaire pour conclure.

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

13232 L'hibernation est une adaptation physiologique et comportementale qui permet la survie de l'espèce pendant les périodes saisonnières défavorables (température extérieure basse et pénurie des ressources alimentaires) Tout au long de l'hibernation, afin d'économiser de l'énergie, l'animal va alterner entre des phases d'hypothermie corporelle profonde, appelées torpeurs, et des phases de réveil avec un retour à la normothermie (température corporelle normale régulée autour de 37°C chez les Mammifères et qui est très consommatrice d'énergie). Des travaux récents suggèrent que cette adaptation physiologique de l'animal impliquerait des phénomènes saisonniers de plasticité neuronale, c. a. d. des modifications de la perception par le cerveau, et notamment par l'hypothalamus, des signaux périphériques qui impliqueraient des modifications structurelles de la barrière formée par les tanicytes qui tapissent la paroi du 3ème ventricule du cerveau. Ces tanicytes forment une barrière qui régule les entrées des signaux de la périphérie vers le cerveau. L'objectif de ce projet est donc de déterminer si des changements structurels dans la fonction de barrière des tanicytes peuvent isoler l'hypothalamus des signaux périphériques avec des caractéristiques différentes selon le moment du cycle de torpeur/réveil et s'il existe des différences liées au sexe dans ce mécanisme.

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

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

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

Pour réaliser ce projet, nous avons besoin de 96 hamsters d'Europe (48 mâles et 48 femelles) distribués en 4 groupes de 12 mâles et 12 femelles, pour une durée maximale du projet de 2 ans.

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

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

Raffinement : Le hamster d'Europe est un animal solitaire, donc chaque animal est maintenu en cage individuelle enrichie avec un bâtonnet de bois à ronger et de la frisure pour faire un nid. Le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience. Les procédures invasives envisagées seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie. La température corporelle sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermo-staté. Les animaux seront

suivis pendant les 15 jours suivant la procédure et leur état de santé sera évalué au moyen d'une grille d'évaluation de l'inconfort, du stress et de la douleur. Afin de limiter la souffrance induite à l'animal, des points limites ont été définis permettant à tout moment d'exclure l'animal de l'étude.

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

13233 Ce projet a pour objectif de mieux comprendre le rôle de la signalisation énergétique cardiaque, plus particulièrement le rôle d'une voie de signalisation intracellulaire médiée par une protéine kinase. Cette protéine kinase est un senseur métabolique qui s'active lorsque la cellule est en déficit énergétique et qui va contrôler les voies métaboliques pour préserver l'homéostasie énergétique tant à l'échelle cellulaire que de l'organisme entier. Elle joue un rôle primordial dans le cœur dont la fonction contractile doit assurer un débit sanguin répondant aux besoins de l'organisme dans différentes situations physiologiques (lors d'un exercice physique par exemple) et aussi pathologiques. Cette fonction contractile adaptée du cœur ne peut être assurée que si son état énergétique est préservé. En utilisant un nouveau modèle de souris transgénique inductible et spécifique aux cardiomyocytes, nous allons caractériser les effets associés à l'absence de cette protéine kinase spécifiquement dans le cœur, sur la fonction de l'organe lui-même et évaluer l'impact que cela peut avoir sur l'organisme entier. Nous souhaitons notamment étudier l'aptitude des souris KO à fournir un effort physique ou à répondre à une augmentation de la fréquence cardiaque. Jusqu'à présent le rôle de cette protéine a été étudié dans différents types de cellules mais peu d'études portent sur sa fonction dans les cardiomyocytes. Ainsi, nous sommes les premiers à étudier de telles souris. L'impact potentiel de cette délétion au cours du temps sur l'anatomie et la fonction cardiaque des souris sera évaluée par imagerie échographique. Ce type d'imagerie est totalement non invasive et elle fait référence comme technique *in vivo* d'évaluation de la fonction cardiaque. Le protocole d'imagerie échographique qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse, il est relativement court (environ 30 minutes d'acquisition d'images), réalisé sous anesthésie gazeuse légère avec utilisation d'un gel ophtalmique. Les animaux retournent dans l'animalerie après leur réveil.

L'étude, qui inclut 140 souris au total, a été planifiée en respectant la règle des 3R : 1-Réduire : L'utilisation de méthodes non invasives permettra un suivi *in vivo* sur une année des animaux. Cette étude longitudinale fournira un maximum de données à partir du même groupe de souris. De plus, le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour chacune des procédures du projet dans son ensemble a été déterminé sur la base d'études publiées, de notre expérience dans le domaine et du calcul de puissance statistique afin de pouvoir valider nos hypothèses. L'exploitation maximale du matériel biologique est également prévue dans l'étude (différents organes seront prélevés, différents dosages réalisés). Enfin, le schéma des groupes expérimentaux permet de reproduire et d'utiliser des animaux de la manière la plus avantageuse possible. 2-Raffiner : Les choix concernant le modèle et les procédures ont été faits conformément à l'état actuel des connaissances et exigences envers ce type d'étude, en veillant au maximum au bien-être des animaux au cours de l'hébergement et du protocole échographique. 3-Remplacer : L'étude des caractéristiques au niveau cardiaque et de l'organisme entier d'un tel KO ne peut être réalisée que sur le modèle animal. Cependant son rôle dans les cardiomyocytes a préalablement été étudié *in vitro*. Ces animaux, après 2-3 jours de récupération retournent dans leur animalerie d'origine pour des études décrites dans un autre protocole. Le transport dure environ 10 minutes et se fait dans une voiture climatisée, dans des conditions de raffinement maîtrisées (cages en plastique avec couvercle, eau et nourriture pour 48h, sciure absorbante).

13234 Ce projet dans le domaine de la biologie évolutive vise à comparer les traits d'histoire de vie de différentes espèces hibernantes en fonction de leur stratégie d'hibernation (fat- : qui jeûnent ou food-storing : qui se nourrissent pendant l'hibernation) afin de comprendre pourquoi l'évolution a retenu ces 2 stratégies. L'approche comparative d'au moins 2 espèces par stratégie est indispensable pour tirer des conclusions valables dans ce domaine. Les données sur les espèces

fat-storing sont obtenues d'autres chercheurs. Nous étudierons au laboratoire 2 espèces food-storing : hamster commun (*Cricetus cricetus*) et tamia de Sibérie (*Tamias sibiricus*). Chez ces 2 espèces, nous allons mesurer le comportement d'hibernation, plus précisément la durée et la profondeur des épisodes d'hypothermie grâce à des mesures de température corporelle (par des capteurs intrapéritonéaux) et de dépense énergétique (en calorimétrie indirecte). Nous allons également mesurer le succès reproducteur (nombre d'accouplement, taille et masse des portées, condition corporelle des juvéniles et leurs taux de croissance) en fonction des différentes stratégies d'hibernation. Dans le cadre d'un suivi longitudinal sur ces animaux, nous réaliserons régulièrement des mesures morphométriques (masse et taille de l'animal, taille des testicules...) et des prélèvements de sang pour des dosages hormonaux. Toutes ces techniques sont couramment utilisées au laboratoire. Les expériences seront réalisées sur 12 couples par an par espèce soit 120 hamsters d'Europe et 120 tamias de Sibérie sur toute la durée du projet.

Dans nos protocoles expérimentaux nous mettons en œuvre la règle des 3R en réduisant le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour qu'une différence éventuelle entre les différents groupes puisse être statistiquement décelée. En termes de raffinement, nous nous adaptons au cycle saisonnier des espèces en limitant les manipulations pendant les torpeurs. Nous enrichissons l'environnement des animaux (tubes en PVC qui leur servent de refuge, papier pour se constituer un nid, bouts de bois à ronger). Enfin, les manipulations sont faites sous sédation afin de limiter le stress des animaux et un analgésique est utilisé pour réduire la douleur liée à la chirurgie. Les animaux sont maintenus sur un coussin chauffant pendant la sédation. Nous avons établi des points limites par procédure expérimentale, permettant le cas échéant, d'extraire un animal de la procédure afin de supprimer sa souffrance. Cette étude ayant pour objectif de comparer des espèces hibernantes, nous ne pouvons pas remplacer ces espèces par un autre modèle d'étude.

13235 Pour élaborer des comportements sociaux adaptés, un animal doit intégrer des informations diverses provenant du corps et de l'environnement. Il doit simultanément évaluer les différentes possibilités qui s'offrent à lui, tout en tenant compte de ses expériences préalables ainsi que de ses motivations et de ses capacités. Le cortex préfrontal intervient dans une grande partie de ces fonctions supérieures, caractéristiques des comportements sociaux. Il reçoit des informations (entrées synaptiques) en provenance de multiples régions du cerveau. Malheureusement, les connaissances sur sa connectivité viennent principalement d'études chez le rongeur. Or les primates ont développé des comportements sociaux plus complexes et cette évolution est associée à une plus grande diversité anatomique et fonctionnelle des régions préfrontales dans leur cerveau. Cependant la connectivité des différentes régions préfrontales reste mal comprise chez le primate, chez qui le traçage neuroanatomique reste un défi majeur.

L'objectif de ce projet est de tracer les réseaux neuronaux d'entrée à deux régions préfrontales, les aires corticales 25 et 32, chez le marmouset. Ceci nous permettra de mieux comprendre comment de multiples informations convergent vers ces aires et participent aux comportements sociaux dont certains (sociabilité, coopération et communication) sont très développés chez cette espèce, ressemblent à ceux exprimés chez l'humain, et semblent impliquer les aires 25 et 32. Cette étude permettra aussi d'évaluer les différences/similitudes de connectomique existantes entre les rongeurs et ce primate non humain pour, ensuite, essayer d'extrapoler chez l'Homme.

Pour ce faire, nous utiliserons des injections ciblées de virus de la rage (souche complète ou déficiente) ainsi que des vecteurs adjuvants pour tracer de façon rétrograde les entrées synaptiques des aires 25 et 32. Toutes les mesures de protection seront mises en place pour prévenir les risques liés aux agents biologiques (Confinement A2). En fonction du vecteur injecté (vitesses de traçages différentes), les animaux seront mis à mort à différents temps post-injection. Après mise à mort, le cerveau est extrait pour subir des traitements immunohistochimiques qui marquent les neurones infectés. Puis, la distribution de l'ensemble des neurones infectés est reconstruite pour révéler l'organisation des réseaux neuronaux connectés aux aires d'intérêt. Ces observations seront corrélées à l'anatomie cérébrale des animaux obtenues préalablement par IRM. L'accès à ces données va nous offrir l'opportunité unique de comprendre les modalités d'informations intégrées

par ces aires du cortex préfrontal ainsi que d'identifier certains sous-types cellulaires recevant les entrées de différentes régions du cerveau.

REMPLEUR

Ce type d'études nécessite un modèle animal puisque les méthodes de traçage neuroanatomique qui permettent de disséquer l'organisation des réseaux nerveux sont invasives (donc inutilisables chez l'humain). D'une manière générale les modèles de primate non humain sont nécessaires en neurosciences intégratives pour des raisons de proximité anatomiques, physiologiques et de comportement social avec l'humain. Contrairement aux rongeurs, les aires corticales supérieures, en particulier celles du cortex préfrontal, sont très développées chez les primates, y compris chez les marmousets. Certains des tests préliminaires qui nous permettront de caractériser les traceurs viraux ne nécessitent pas d'être réalisés chez des primates mais chez le rat.

REDUIRE

Nous estimons nos besoins pour ce projet à 42 marmousets et 12 rats. Ce nombre prend en compte les besoins en expériences préliminaires (comme la caractérisation des temps de transport du virus de la rage). Ces expériences préliminaires (18 marmousets et 12 rats) doivent nous permettre de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaires à chaque test expérimental aussi bien au sein de ce projet que dans d'autres projets qui utiliseront les mêmes approches. Le nombre total d'animaux tient également compte du nombre de marmousets (24) nécessaires aux expériences de traçage des entrées synaptiques aux aires 25 et 32. Dans les publications impliquant des primates non humains, chaque résultat doit être obtenu au moins 2 fois, et préférentiellement 3 fois pour être considéré comme valide. Il nous faudra donc reproduire un test expérimental jusqu'à ce que nous obtenions une bonne qualité de résultats chez 2 individus. Etant donnée la difficulté des expériences entreprises, nous estimons qu'il nous faudra en moyenne 4 animaux par test et nous considérons un total de 6 tests.

Il est important de noter que nous profiterons pour certaines de nos expériences des animaux qui devraient être mis à mort pour des raisons de gestion de colonie (ex. conflits dans les groupes ou réduction d'un éventuel sureffectif dans le centre d'élevage). Il est aussi nécessaire de mentionner que lors des anesthésies nécessaires aux chirurgies, nous réaliserons de prélèvements des poils du dos avec le bulbe afin d'extraire l'ADN génomique ce qui permettra de mettre au point la caractérisation génétique de notre colonie de marmousets. Ceci permettra sur le long terme d'optimiser le choix des animaux pour certains tests expérimentaux dans d'autres projets.

RAFFINER

Nous réaliserons des images anatomiques IRM chez les marmousets afin de mieux guider les injections intracérébrales de virus. Les prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront systématiquement selon des procédures validées par le vétérinaire. Pour les chirurgies, nous utiliserons une anesthésie locale aux points d'ouverture de la peau en plus d'une anesthésie générale. A la suite d'une injection de virus de la rage, l'animal doit être placé en isolement dans un espace de confinement adapté. Bien que ces procédures seront suivies d'une mise à mort relativement rapide (<6 jours), les animaux recevront un enrichissement renforcé (visites au moins toutes les 8-12h, variété des objets d'exploration) pour atténuer le stress de l'isolement. Il est important de noter que ces temps de survie sont généralement trop courts pour permettre l'apparition de symptômes liés aux injections de rage. Pour les autres formes de virus, les périodes de survie post-chirurgie pourront aller jusqu'à 3 mois ce qui permettra dans la majorité des cas la réintégration de l'animal dans son groupe familial

13236 Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est la maladie valvulaire la plus fréquente dans les pays industrialisés, affectant 2 à 6% des sujets de plus de 65 ans. Elle est le résultat d'un processus lent et progressif menant à la calcification de la valve aortique, et donc à son dysfonctionnement. La conséquence est la constitution d'un obstacle à l'éjection du sang depuis le cœur vers le reste de l'organisme. Son pronostic est mauvais dès l'apparition des symptômes (essoufflement, douleurs thoraciques) avec un taux de mortalité atteignant 50% à deux ans. Même si des progrès ont été accomplis, aucun médicament n'a montré son efficacité dans la prévention ou le ralentissement de

la maladie. Le seul traitement disponible est le remplacement de la valve aortique (par voie chirurgicale ou endovasculaire) lorsque le RAC est sévère et responsable de symptômes. En l'absence de traitement, l'insuffisance cardiaque et le décès sont inévitables.

En étudiant les principales cellules isolées de valves aortiques humaines calcifiées et saines, notre équipe a mis en évidence, au laboratoire, le rôle protecteur d'une molécule sur les mécanismes de calcification de la valve aortique. Cette molécule et 2 autres similaires sont ou ont déjà été utilisées comme traitement chronique chez l'homme dans des pathologies autres que le RAC.

Notre hypothèse de travail est que cette molécule serait efficace dans un organisme vivant comme elle l'a été au laboratoire sur des échantillons de cellules de valves aortiques humaines.

L'objectif de notre étude sera de confirmer l'efficacité de cette molécule dans la progression du RAC chez l'animal. A terme, cette molécule devrait être utilisée chez l'homme comme traitement ralentissant le processus de calcification de la valve aortique.

Notre laboratoire dispose d'une expertise dans un modèle animal dans lequel nous sommes parvenus à recréer les conditions du RAC de manière accélérée : il s'agit d'implanter une valve aortique de porc chez l'agneau selon la technique utilisée chez l'homme, sous circulation extracorporelle. Nous prévoyons ainsi de tester 3 molécules différentes et leurs effets sur la diminution des calcifications, en faisant suivre à l'agneau un traitement quotidien par voie orale pendant 4 mois. La deuxième partie du travail consistera à fixer l'une de ces molécules (celle dont l'effet sur les calcifications aura été le plus important) directement sur la valve de porc, avant implantation chez l'agneau.

Au total 53 animaux seront utilisés sur 5 ans et répartis en plusieurs groupes. La première procédure comportera 43 animaux, 8 dans le groupe contrôle, 35 dans 3 groupes différents selon les molécules testées sous différentes doses. Les animaux seront suivis pendant 4 mois. Des prélèvements sanguins seront réalisés de façon journalière durant la première semaine après la chirurgie puis de façon mensuelle et une échographie cardiaque sera réalisée 7 jours après implantation puis mensuellement. L'agneau sera sacrifié au bout des 4 mois afin de prélever le cœur pour analyser la valve aortique selon différentes modalités (imagerie, analyses biochimiques et tissulaires), la survie sans valve aortique étant impossible.

Le respect de la règle des 3R a été une préoccupation constante dans la préparation du protocole de notre étude. Le recours à un modèle animal est l'étape indispensable avant l'application de nos travaux de recherche chez l'homme car 1) il n'existe pas de modèle alternatif connu pour l'étude du RAC permettant de remplacer l'utilisation de l'animal et 2) les molécules qui seront testées n'ont jamais été testées chez l'homme dans le cadre du RAC. L'analyse statistique réalisée nous a permis de définir un nombre réduit d'animaux (53) permettant d'atteindre les objectifs de ce projet et d'avoir une réponse statistiquement analysable. Enfin, les expériences seront réalisées selon les normes en vigueur. Le bien-être de l'animal sera respecté à chaque étape du travail (temps d'adaptation à l'arrivée dans l'animalerie, hébergement par 2 en animalerie conventionnelle, eau et nourriture à volonté). L'intervention chirurgicale sera pratiquée sous anesthésie générale avec une sédation préalable et un traitement antalgique adapté. Les agneaux recevront un traitement antalgique et antibiotique durant la première semaine postopératoire, et la nourriture sera mise à disposition dans les 24 heures après l'opération.

Les effets secondaires potentiels des traitements médicamenteux seront surveillés cliniquement de manière quotidienne et biologiquement de manière mensuelle, de telle sorte que le traitement sera interrompu, avec éventuellement sacrifice de l'animal, si la souffrance de celui-ci est jugée inacceptable selon les critères en vigueur.

13237 La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative efficace à l'insulinothérapie chez les diabétiques de type 1, mais limitée par le manque de donneurs et le recours aux immunosuppresseurs. C'est pourquoi, nous avons développé un dispositif d'encapsulation de cellules sécrétrices d'insuline, imperméable aux molécules impliquées dans le rejet mais perméable au glucose, à l'insuline, aux nutriments. Ainsi, aucune immunosuppression n'est nécessaire et des sources alternatives de cellules seraient utilisables.

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

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

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

Dans une seconde phase, des rats receveurs sont implantés avec des dispositifs assemblés avec des membranes de porosités différentes. Chaque animal recevra des injections successives de chacun des types cellulaires, dans l'ordre indiqué plus haut. Les quantités injectées seront celles déterminées dans la première phase de l'étude. Afin d'étudier la réaction de rejet suite à l'injection des différents types cellulaires, les niveaux sanguins de plusieurs marqueurs inflammatoires ainsi que la présence d'anticorps contre les cellules injectées seront déterminés. Si les résultats ne montrent aucune réaction immunitaire pour le 1er type cellulaire, le deuxième sera injecté et ainsi de suite. En cas de résultats positifs, l'étude s'arrêtera pour le receveur qui sera alors mis à mort. Cette étude permettra de déterminer le meilleur compromis entre une protection des cellules et une porosité permettant des échanges optimaux entre l'intérieur du dispositif et la circulation sanguine. La meilleure version du dispositif selon ces critères sera utilisée pour répéter les différentes phases décrites ci-dessus en injectant 4 sources de cellules sécrétrices d'insuline dérivées de cellules souches.

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

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

Raffinement : Il intervient au niveau de l'anesthésie, réalisée au gaz pour un meilleur contrôle, et de la prise en charge post-opératoire par l'administration d'un anti-inflammatoire et anti-douleur. Il intervient également un niveau de l'hébergements avec des conditions de température et

d'hygrométrie contrôlées, un enrichissement des cages et un accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Le raffinement est aussi présent dans le suivi des animaux, avec l'utilisation d'une grille d'évaluation adaptée aux procédures, qui permet de détecter rapidement la souffrance, la douleur chez les animaux et de mettre en place les traitements adaptés.

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

13238 Cette formation à la pose de cathéters de dialyse et à la réalisation de biopsies rénales sous repère échographique est destinée aux internes de néphrologie afin de leur donner les connaissances nécessaires et les gestes techniques leur permettant de réaliser ces actes en pratique clinique courante chez les patients. En effet, la néphrologie est une spécialité médico-technique nécessitant une formation à la réalisation de ces gestes spécifiques, pour lesquels l'expérience de l'opérateur est cruciale pour réduire l'incidence des complications. De plus, les recommandations imposent la réalisation de ce geste sous contrôle échographique, ce qui peut engendrer une difficulté supplémentaire.

Les exigences en termes de qualité de soins et de sécurité pour les patients sont croissantes. Ce qui est désormais le dogme en chirurgie « jamais la première fois sur le patient » doit s'appliquer à toute réalisation de geste médico-technique potentiellement à risque pour le patient ; la courbe d'apprentissage de ces gestes doit être la plus rapide possible.

A l'heure actuelle il n'existe pas de formation spécifique à la réalisation de ces gestes dans l'ensemble des CHU.

Nous proposons donc d'organiser des sessions pédagogiques d'utilisation de ces techniques échoguidées sur modèle porcin (porc Pietrain, 40 +/- 5 kg). Ce modèle a été choisi pour ses nombreuses similarités physiologiques et anatomiques avec l'Homme. Le modèle porcin présente également l'avantage de pouvoir utiliser du matériel et des équipements identiques à celui dédié à l'Homme. Par ailleurs, avec un seul animal, il est possible de réaliser de nombreuses procédures permettant la formation de plusieurs personnes en limitant grandement le nombre d'animaux. En parallèle, la formation comprendra également des sessions sur simulateurs ce qui permettra de réaliser une étude comparative sur l'apprentissage par modèle *in vivo* versus *in silico*. L'étude prévoit également un suivi des internes formés tout de long de leur internat afin de comparer l'efficacité de la formation *in silico* versus *in vivo* sur le moyen et long terme. Cela nous permettra, si les résultats sont concluants de remplacer l'apprentissage sur animal par l'apprentissage par simulation pour limiter l'utilisation du modèle animal.

Au cours d'une session destinée à 8 internes, la formation sera réalisée sur 1 seul animal lors d'une procédure sans réveil. Chaque interne exécutera à tour de rôle des gestes techniques sous la supervision d'un néphrologue enseignant. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, nous avons développé dans cet enseignement des méthodes de vidéo-retransmission des gestes : les autres participants profiteront en temps réel de chaque acte réalisé.

Il sera organisé jusqu'à 4 sessions par an (en fonction du nombre d'inscrits), impliquant l'utilisation maximale de 4 animaux par an, soit un total de 20 animaux pour les 5 ans du projet. La particularité de cet accompagnement est d'offrir tout de temps nécessaire au participant pour parfaire ses gestes et ses connaissances de manière interactive sans les contraintes habituelles liées au respect et aux exigences des protocoles en matière de durée.

Toutes les procédures invasives seront effectuées sous anesthésie générale avec utilisation d'analgésiques, dans un objectif de raffinement des procédures. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs bénéficieront d'une période d'acclimatation de 7 jours avant toute manipulation, ils auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront hébergés en groupe de 2 à 8 pour permettre un contact régulier entre

congénères et réduire le stress dans un box de 9m² avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes à mâcher, jouets et balles anti-morsure).

13239 La Sclérodémie Systémique (ScS) est une maladie systémique auto-immune rare caractérisée par des lésions microvasculaires, une fibrose cutanée et viscérale et un état d'auto-immunité. La ScS se caractérise par une fibrose tissulaire intéressant la peau et différents organes, en particulier le poumon. Parmi les décès en rapport avec la ScS, 35 % environ sont la conséquence de la fibrose pulmonaire. En ce qui concerne la qualité de vie, le handicap de la main en partie lié à la fibrose cutanée participe à 75% au handicap global de la maladie. A ce jour, les traitements proposés visent l'inflammation, dans l'espoir de limiter le développement de la fibrose. Très récemment, des études sur le nintedanib (nouvelle thérapie) ont montré son efficacité en ralentissant le déclin de la capacité vitale forcée (CVF) à 1 an par rapport au placebo mais sans effet sur la fibrose cutanée. De nouvelles thérapeutiques sont ainsi toujours attendues pour améliorer la prise en charge de ces patients. La Fraction Vasculaire Stromale (FVS) du tissu adipeux est source de cellules souches dites « mésenchymateuses » mais contient aussi de nombreuses autres cellules. Ce cocktail cellulaire a des propriétés réparatrices, angiogéniques, immunomodulatrices et antifibrotiques intéressantes pour traiter les lésions observées au cours de la ScS. La FVS a montré son efficacité sur la fibrose cutanée au niveau du visage et des mains après une administration sous-cutanée. Au vu de l'efficacité de l'injection intra-veineuse de cellules souches mésenchymateuses dans le modèle murin de ScS induite par l'acide hypochloreux (HOCl), nous souhaitons développer une approche thérapeutique systémique basée sur l'utilisation de la FVS injectée en intra-veineux pour lutter contre la fibrose pulmonaire et cutanée. Pour cela, nous avons choisi pour une première étude pré-clinique de « preuve de concept » de transposer le modèle de sclérodémie induite par l'HOCl de la souris chez le rat afin d'obtenir une quantité suffisante de tissu adipeux nécessaire au recueil de la FVS et d'évaluer l'effet thérapeutique de l'injection intra-veineuse de la FVS hétérologue mais aussi autologue.

Ce projet va se dérouler en 2 temps à savoir tout d'abord la mise au point du modèle chez le rat puis l'évaluation de l'effet de la FVS chez les rats sclérodermiques sur la fibrose cutanée et pulmonaire.

Pour la mise au point du modèle, 24 rats au maximum sont nécessaires. Une fois le modèle validé, 48 rats seront nécessaires pour évaluer l'effet de l'injection de la FVS hétérologue et 27 rats seront nécessaires pour évaluer l'effet de l'injection de la FVS autologue. Ainsi, un maximum de 99 rats seront utilisés dans ce projet. Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet.

Le nombre de rats prévus est minimum mais suffisant pour chaque étape pour espérer obtenir des résultats significatifs lors de nos analyses statistiques. Pour la mise au point du modèle, nous avons décidé de tester 2 doses d'acide hypochloreux d'emblée afin de limiter le nombre de rats témoins nécessaires et on l'espère de ne pas avoir à tester 2 autres doses ou une durée d'induction plus longue avec 12 rats supplémentaires. Pour l'étude de l'efficacité de la FVS, nous avons aussi prévu l'évaluation de 2 doses différentes de FVS dans le même temps afin de limiter le nombre de rats témoins également. L'évaluation de la FVS autologue permettra si les résultats avec la FVS hétérologue sont comparables de ne plus avoir à utiliser des rats uniquement pour le recueil de la FVS à l'avenir et chez les patients seuls la FVS autologue est envisageable. Le suivi de l'apparition et de la régression de la fibrose par imagerie permet également de limiter le nombre de rats puisque tous les rats seront mis à mort uniquement à la fin de l'expérimentation et non à chaque point d'évaluation.

Les rats seront hébergés par 2 en armoire ventilée durant la période d'acclimatation puis d'expérimentation pour diminuer leur stress. Chaque cage sera agrémentée de tunnel rouge afin d'amener un enrichissement aux rats et les stimuler dans la réalisation de leur propre nid au sein de la cage. Ils auront à disposition nourriture et eau, le cycle jour nuit sera respecté et la température ambiante sera de 22°C. Une petite balle en plastique pourra être mise dans la cage afin qu'ils puissent se divertir le temps où nous ne sommes pas présents.

Toutes les manipulations seront réalisées par du personnel formé afin d'optimiser le bien-être des rats et l'obtention de résultats positifs. Les injections sous-cutanées pour l'induction de la maladie

seront réalisées après l'application d'une crème anesthésiante et avec l'administration en systématique de paracétamol. Le recueil du tissu adipeux se fera sous anesthésie générale avec une analgésie post-opératoire. L'injection de la FVS et les imageries prévues seront réalisées sous anesthésie également. De plus, la douleur et le bien-être des rats seront évalués quotidiennement tout au long de l'expérimentation afin d'adapter leur prise en charge en fonction. Si une souffrance sévère irréversible était objectivée, une mise à mort du rongeur sera réalisée sans délai.

Les résultats de ce projet pourraient permettre d'envisager de passer chez l'homme.

13240 L'incidence de la douleur cancéreuse est particulièrement élevée chez les patients ayant des métastases osseuses. Les symptômes sont une douleur persistante augmentant en intensité avec la progression de la pathologie et la survenue d'épisodes douloureux spontanés très intenses, imprévisibles, et réfractaires aux traitements antalgiques usuels. Le but de l'étude est de rechercher si de nouveaux antalgiques, que nous avons découvert comme étant efficaces pour le traitement de douleurs inflammatoires et neuropathiques, ont un effet antalgique chez un modèle de douleur osseuse de métastases de prostate. Nos résultats préliminaires suggèrent l'intérêt de plusieurs molécules ayant un effet antalgique chez ce modèle animal *in vivo* et un effet bénéfique vis à vis de la prolifération de cellules cancéreuses *in vitro*. Il nous faut maintenant évaluer l'effet de ces molécules sur les remodelages osseux associés à la progression tumorale *in vivo* en utilisant des techniques d'imagerie sur petit animal. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet. Des cellules de cancer de prostate modifiées pour exprimer de la bioluminescence seront utilisées pour permettre un suivi longitudinal de l'évolution tumorale *in vivo* en imagerie optique sans sacrifier les animaux. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement interprétables. De plus, pour l'ensemble des procédures, les animaux seront placés sous anesthésie générale. Par ailleurs, la surveillance quotidienne des animaux permettra de réagir rapidement en cas de signe d'inconfort, de stress ou de douleur. Si besoin, une injection d'antalgiques sera réalisée (Rimadyl 5mg/Kg 1 fois par jour pendant 5 jours maximum). Le nombre maximal d'animaux nécessaire est estimé à 412 souris pour la durée (3 ans) du projet.

13241 Le pemphigus foliacé (PF) est une dermatose auto-immune décrite chez l'homme, le chien, le chat, les chevaux et les ruminants. Cette maladie est caractérisée par des pustules cutanées, intra-épidermiques, qui se forment à la suite de la fixation d'auto-anticorps sur des protéines des desmosomes épidermiques. La clinique, la cytologie et l'histopathologie de cette maladie ont été bien décrites chez l'homme, le chien, le chat et le cheval. En revanche, on n'a pu montrer la présence des auto-anticorps circulants et fixés que chez l'Homme et le Chien. La technique de choix consiste à injecter du sérum du sujet malade à un souriceau nouveau-né, par voie sous-cutanée. Le transfert des anticorps se fait alors et l'on peut prélever la zone d'injection pour réaliser des recherches d'anticorps fixés par immunofluorescence directe ou indirecte. Pour chaque essai du sérum d'une nouvelle espèce, une étude pilote permettra d'étudier la dose de sérum non toxique qu'il est possible d'injecter.

Notre projet consiste donc à mettre au point la technique pour de nouvelles espèces animales, pour pouvoir ainsi progresser dans la connaissance de la maladie en mettant en évidence la présence des auto-anticorps. La technique de transfert d'anticorps par injection sous-cutanée à un souriceau nouveau-né est actuellement la seule technique fiable, et la moins invasive (remplacement). Elle utilise un nombre réduit d'animaux à un stade très précoce, lorsque que le nouveau-né est peu sensible. Les volumes injectés sont très faibles, indolores, et le souriceau est maintenu sous la mère. Il est ensuite euthanasié sans douleur pour le prélèvement de la zone d'injection en vue d'analyse (raffinement).

Notre projet prévoit, sur 5 ans, d'utiliser un nombre réduit à 115 souriceaux nouveau-nés (réduction), ce qui nous permettra de progresser dans les connaissances de la maladie chez le Cheval, le Chat, et le Bovin, entre autres. C'est le nombre minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables pour ces recherches. Pour réduire le nombre d'animaux, les prélèvements de peau

seront conservés et réutilisés ultérieurement pour des recherches sur d'autres maladies de peau des animaux domestiques.

13242 La paralysie cérébrale (CP) est la principale cause de handicap moteur chez l'enfant (prévalence 2‰), liée à des lésions cérébrales autour de la naissance. Tandis qu'en l'absence de lésion cérébrale, les troubles d'acquisition de la coordination (DCD ; 5-6% des enfants scolarisés) correspondent à des troubles sensorimoteurs, allant de difficultés à des déficits majeurs, qui sont associés à des désordres comportementaux et cognitifs, tels que les troubles autistiques, les troubles de l'apprentissage, de l'acquisition du langage et autres. Ces deux désordres neurodéveloppementaux sont étroitement liés à la prématurité. En effet, plus un enfant est né prématuré plus il est susceptible de développer ces désordres ; or la prématurité est en nette augmentation ces dernières décennies.

Nous avons développé des modèles de rongeurs reproduisant l'ensemble de ces symptômes afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces désordres, et surtout dans ce projet de recherche nous cherchons à développer des pistes de prévention de l'émergence de ces désordres. Un premier modèle, consistant à restreindre les mouvements pendant le développement, reproduit les symptômes des DCD. Nous envisageons d'étudier l'influence de l'administration précoce de la toxine botulique ou la supplémentation en triptophane, un précurseur de la sérotonine impliquée dans le développement du cerveau. Notre deuxième modèle, basé sur une hypoperfusion intrautérine, reproduit les symptômes de l'encéphalopathie de la prématurité. Nous cherchons à étudier les effets de l'érythropoïétine (amélioration du métabolisme respiratoire et sanguin) ou des cellules souches mésenchymateuses (produisant des molécules anti-inflammatoires) sur la prévention des désordres de l'encéphalopathie de la prématurité. Nous cherchons à mieux caractériser ces modèles animaux et tester les pistes de prévention/remédiation les mieux adaptées.

L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ce projet requiert un nombre total de 520 rats. Les mêmes animaux seront utilisés pour les tests comportementaux, électrophysiologiques puis histologiques afin d'en réduire le nombre. Le développement de modèles animaux afin d'étudier les pistes thérapeutiques ne permet pas de possibilités de remplacement par des études *in silico* ou totalement *in vitro*. Nous avons amélioré le raffinement, notre priorité pour le bien-être animal, en augmentant les procédures avec anesthésie et analgésiques (antidouleurs) et en réduisant et limitant le nombre d'animaux utilisé par rapport au projet précédent.

13243 La glande lacrymale est l'organe majoritairement responsable de la production du film lacrymal protégeant la surface de l'œil des agressions externes. Une glande lacrymale défectueuse mène à l'apparition de symptômes d'œil sec. Avec l'augmentation de la pollution environnementale et le vieillissement de la population, le syndrome d'œil sec touche un nombre croissant d'individus, avec notamment une incidence plus forte chez les personnes âgées.

Bien que la sécrétion de la glande lacrymale soit assez bien décrite dans la littérature, le développement de celle-ci reste peu détaillé. Néanmoins, la recherche fondamentale tendant à la compréhension des mécanismes essentiels se déroulant au cours de la formation de cette glande sont nécessaires. L'accroissement des connaissances dans ce domaine permettra la progression de traitements visant à la régénération des fonctions physiologiques de la glande endogène.

Le but de notre projet est de caractériser l'influence des propriétés physiques et mécaniques sur le développement de la glande lacrymale, et notamment lors de la formation des conduits lacrymaux pendant le développement embryonnaire chez la souris.

Ce projet, défini pour une durée de 5 ans, ne peut être envisagé que par l'utilisation de modèles animaux. En effet, les modèles d'organoides de glande lacrymale utilisent déjà des animaux et ne récapitulent pas toutes les caractéristiques physiologiques de la glande. Il n'existe pas de modèle alternatif permettant de comprendre l'ensemble des caractéristiques de la glande lacrymale dans un contexte physiologique.

Pour cette étude, nous projetons d'utiliser un maximum de n= 1100 embryons plus souris sauvages, soit 100 souris adulte gestantes permettant de récolter :

- 850 embryons au jour embryonnaire 15
- 50 embryons au jour embryonnaire 16
- 50 embryons au jour embryonnaire 17
- 50 embryons au jour embryonnaire 18

Les expériences conduites seront planifiées de façon strictes et efficaces afin d'optimiser le respect des règles de réduction, raffinement et remplacement. Les n proposés représentent un nombre minimum mais suffisant d'animaux pour tirer des conclusions fiables et répondre à nos questions scientifiques.

Les souris gestantes seront sacrifiées à 15, 16, 17 et 18 jours de gestation et les embryons récoltés. Les glandes lacrymales seront disséquées à partir de ces embryons et mises en culture afin d'étudier le développement du conduit lacrymal par imagerie sur matériel vivant, ou directement fixées pour des analyses immunologiques.

Les tissus adultes et embryonnaires seront partagés avec d'autres membres de l'équipe travaillant sur les intestins dans le but de mutualiser les animaux et réduire le nombre d'animaux utilisés. Le bien-être des animaux sera de la plus haute importance, visant à réduire au maximum le stress. Par ailleurs, l'utilisation de cultures cellulaires ou de modèles computationnels seront privilégiés dans la mesure du possible avant le passage au modèle *in vivo*.

13244 L'activité du laboratoire est orientée vers l'étude et la caractérisation des processus inflammatoires qui rendent compte de la pathogénèse du paludisme, des dommages systémiques qui sont explorables chez des souris de laboratoire auxquelles est inoculé *Plasmodium berghei* (Pb) ANKA, l'une des espèces plasmodiales de rongeur sauvage adaptée à la souris de laboratoire. Nous étudions en particulier les relations entre les perturbations homéostatiques dans le foie engendré soit par des processus inflammatoires, soit lors de co-infections, et le développement intrahépatique du parasite *Plasmodium*.

La phase hépatique de l'infection par *Plasmodium* est immunologiquement silencieuse et correspond à un état de tolérance qui prédomine naturellement dans ce tissu. Dans notre projet de recherche nous faisons l'hypothèse que la tolérance immunitaire hépatique favorise le développement du parasite *Plasmodium* dans le foie de l'hôte. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des souris déficientes pour le gène *mdr2* (Multidrug resistance-2) dont l'absence engendre une inflammation hépatique. En utilisant ce modèle, nous avons montré que contrairement aux souris sauvages, les souris *Mdr2*^{-/-} infectées avec le parasite ne développent pas de stade sanguin et mettent en place une immunité anti-parasitaire durable.

Le parasite *Plasmodium* n'est pas le seul pathogène ayant un tropisme pour le foie, le virus de l'hépatite B (VHB) n'infecte et ne se multiplie également que dans le foie. De plus, en zone endémique, les deux infections co-existent chez l'homme. L'objet de cette étude est donc de développer un modèle murin qui rend compte de l'effet d'une infection virale sur la sévérité ou non de la malaria. L'hypothèse que nous formulons est que l'inflammation engendrée par l'infection virale crée des conditions défavorables au développement du parasite *Plasmodium*.

Le VHB est incapable d'infecter naturellement les hépatocytes de souris, néanmoins il existe un modèle de réplication du VHB *in vivo* chez la souris utilisant un vecteur viral (basé sur le virus adeno-associé (AAV)) pour délivrer le génome du VHB dans le foie. Ce vecteur permet au VHB de se répliquer dans le foie de souris immunocompétentes, de produire les particules virales et de reproduire ainsi les différents paramètres virologiques de l'infection chronique. L'expression du VHB dans les souris n'induit aucune pathologie et par conséquent aucun signe de souffrance ni d'inconfort ne sont observés au cours de l'infection virale. A l'inverse, l'infection par PbANKA engendre une pathologie cérébrale (neuropaludisme) au 8e jour de l'infection et de ce fait, la mise à mort des souris sera effectuée au 6e jour de l'infection au moment où aucun symptôme n'est visible. Les animaux seront surveillés étroitement tous les jours pour identifier au plus tôt toute

anomalie (lors de souffrance apparente de l'animal, poil hérissé, baisse de la motricité, l'expérience sera interrompue et les animaux mis à mort). Dans ces conditions cette procédure peut être considérée comme modérée.

L'infection des souris avec le parasite est réalisée en inoculant les sporozoïtes, formes infectieuses du parasite Plasmodium, que nous récoltons au sein des glandes salivaires de moustiques anophèles femelles infectées suite à un repas sanguin sur des souris infectées. Cette procédure est de classe légère, car n'entraînant aucune lésion, ni inconfort ni douleur.

Dans un souci de remplacement, des expériences préliminaires ont été réalisées sur des systèmes cellulaires en culture qui nous ont conduits au point d'explorer les mécanismes physiopathologiques *in vivo*. A cet effet, nous utiliserons des modèles de souris pour évaluer l'effet de l'infection par le VHB sur la capacité du parasite Plasmodium à se développer dans le tissu hépatique. Cette évaluation se fera par le suivi des paramètres sérologiques et biochimiques (antigènes viraux, transaminases) côté HBV et la détermination de la charge parasitaire côté Plasmodium, ainsi que l'étude des réponses immunitaires anti-parasitaires. Le suivi de la parasitémie au cours du temps, tous les deux jours, par le prélèvement de quelques microlitres de sang à la veine caudale par le moyen d'une seringue à insuline, a l'avantage d'être à la fois une méthode non invasive qui évite de stresser les animaux et permet de réduire le nombre d'animaux utilisés pour le projet. A la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort pour analyser les réponses cellulaires induites par la co-infection. L'emploi de tests statistiques adéquats et validés par un biostatisticien nous a permis d'identifier le nombre minimal suffisant d'animaux à utiliser pour obtenir des résultats exploitables.

30 souris seront nécessaires pour réaliser la production de sporozoïtes (sévérité légère), et 270 souris seront utilisées la coinfection virale et parasitaire (sévérité modérée). Le bénéfice attendu du projet est d'explorer les mécanismes de contrôle parasitaire mis en œuvre lors d'une co-infection HBV/Plasmodium, situation courante en zone endémique mais malheureusement très peu étudiée. De plus, ce projet pourrait éclairer nos connaissances sur les réponses immunitaires nécessaires à la clairance parasitaire lors d'une co-infection chronique par le VHB chez l'homme.

13245 Entre les repas ou lors d'un jeûne, l'organisme est capable de maintenir le taux de glucose (sucre) dans le sang (glycémie) à environ 1g/L, grâce à une production par le foie, les reins et l'intestin. Cette fonction est affectée dans le cadre du diabète de type 2, qui est caractérisé par une production de glucose trop importante, entraînant des hyperglycémies. En plus des dérégulations de la glycémie, le diabète est caractérisé par le développement de complications hépatiques importantes telles que l'accumulation de graisses pouvant mener au développement de cancers hépatiques qui sont une cause majeure de morbidité. La compréhension des mécanismes sous-jacents est nécessaire pour la mise en place de traitements adaptés.

Dans cette étude, nous étudierons le développement de la fibrose et des tumeurs hépatiques chez des souris transgéniques dont la production de glucose est activée ou inhibée dans l'intestin. Le processus sera accéléré par un régime spécifique (déficient en méthionine et en choline).

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R :

Remplacement :

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux puisque la fonction étudiée, la production de glucose par l'intestin, a des impacts sur l'ensemble du métabolisme de l'organisme et implique des dialogues entre organes. En effet, le glucose produit par l'intestin est détecté au niveau des senseurs de glucose dans les vaisseaux qui vont transmettre un signal nerveux au niveau du cerveau. En réponse, le cerveau va émettre des signaux nerveux en périphérie, régulant en particulier le métabolisme du foie.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et du métabolisme glucidique, mais aussi des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse

statistique, des groupes de 12 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 120 souris mâles transgéniques et contrôles.

Raffinement :

Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Les procédures sont maîtrisées par les personnes en charge de l'expérimentation animale. Les souris seront nourries avec un régime connu pour favoriser le développement d'une fibrose spécifiquement dans le foie chez la souris. Pour limiter l'effet délétère de ce régime, nous avons choisi un régime enrichi en graisse et comportant 0,1% de méthionine ce qui permet de limiter la perte de poids. Nous suivrons le développement potentiel des tumeurs par IRM et par palpation abdominale. De plus, des tests biologiques permettant de suivre les dommages hépatiques seront réalisés, et le comportement des animaux sera surveillé. L'ensemble de ces paramètres nous permettra de mettre fin au protocole si les tumeurs sont trop nombreuses ou trop grosses ou si l'atteinte hépatique est importante.

Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

Ce projet devrait permettre de déterminer les conséquences d'une dérégulation de la production intestinale de glucose sur le développement de la fibrose et des tumeurs dans le foie.

13246 Notre projet vise à étudier les effets anti-diabétiques d'une nouvelle molécule, hepatocarcinomainstestine-pancreas (HIP), qui pourrait agir en synergie avec l'insuline limitants ainsi les risques d'hypoglycémies et la prise de poids. Les effets de la molécule HIP sur la résistance à l'insuline ont été brevetés et une étude chez l'Homme doit démarrer en 2020-21. Brièvement, la protéine HIP est une protéine qui possède de réparation et de régénération tissulaires. Les études récentes ont permis de démontrer que le mécanisme d'action principal est une activité anti-oxydante. Notre projet s'inscrit donc dans ce contexte d'aller plus loin dans l'étude de l'action de HIP vis-à-vis du traitement du diabète de type 2. Le projet consistera à tester l'effet de plusieurs doses de HIP avec ou sans insuline chez des souris et des rats mâles soumis à un régime hyperlipidique induisant un diabète ou bien génétiquement obèses et diabétiques. Nous mesurerons tout d'abord l'évolution du poids corporel de ces souris pendant toute la durée de l'étude ainsi que la prise alimentaire. Notre hypothèse est qu'en diminuant les doses d'insuline, nous devrions diminuer également la prise de poids. Nous mesurerons aussi dans ces conditions des paramètres plasmatiques reflétant le métabolisme du glucose et des lipides (glycémie à jeun, insulinémie à jeun, triglycérides, cholestérol). Enfin nous réaliserons des tests de tolérance au glucose et à l'insuline pour mesurer les effets du traitement pour contrôler la glycémie en mimant un rapport en sucre (test de tolérance au glucose) ou un traitement à l'insuline. En résumé notre projet (en relation étroite avec la phase clinique qui sera également réalisée) devrait valider l'effet amplificateur de cette nouvelle molécule anti-diabétique sur l'action de l'insuline. Ceci permettra de réduire les doses d'insuline injectée et de prévenir ainsi les accidents hypoglycémiques. Notre projet se fera avec des souris et des rats afin de tester l'effet de la molécule sur 2 espèces différentes. Le nombre total d'animaux est de 220 : 200 souris et 20 rats.

Remplacement : Notre projet correspond à un travail de phase préclinique visant à tester l'effet anti-diabétique d'une nouvelle molécule. C'est donc un passage obligé vers la clinique et l'Homme. Il n'existe pas actuellement de modèle *in vitro* permettant de reproduire la complexité d'un organisme vivant.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux (n=10) par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et interprétables. En effet, dans ce domaine de la diabétologie et le type de mesures que nous allons effectuer, un nombre égal à 10 est largement documenté pour donner des résultats fiables et pertinents.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la

douleur est prévue avant pendant et après l'opération. La persistance au-delà de 24h de signaux de souffrance entraînera l'euthanasie de l'animal.

Nous avons inclus dans les procédures des grilles de suivi de poids et de la prise alimentaire des animaux avec des pesées hebdomadaires depuis le début des traitements et journalières après l'implantation de cathéter (protocole du clamp hyperinsulinémique-euglycémique). Nous avons défini une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites précis.

13247 Les systèmes de production de ruminants sont de plus en plus souvent soumis à des environnements changeants. Pour faire face à ces perturbations, il est nécessaire de sélectionner des animaux résistants et capables de produire lait et/ou viande dans ces environnements.

La robustesse se définit comme la capacité des animaux d'élevage à survivre et à maintenir leurs fonctions de lactation, reproduction et santé dans des environnements changeants. C'est une caractéristique difficile à appréhender car elle est multifactorielle. Une des approches les plus couramment utilisées pour étudier la robustesse des animaux est de les soumettre à des challenges temporaires et de suivre leurs réponses au cours du temps, en mesurant et analysant leurs paramètres zootechniques, physiologiques, métaboliques, comportementaux, etc... avant, pendant et après la perturbation.

Ce type d'expérimentation ne peut pas être remplacé par des modèles *in vitro* mais le nombre d'animaux et la méthodologie choisie tient compte des critères de réduction et raffinement (règle 3R). Le nombre de vaches utilisé est limité à 48 (24 de race Holstein et 24 de race Montbéliarde). Il s'agit du nombre minimum afin de garantir une variabilité de réponses animales représentatives de la diversité rencontrée en pratique, de mettre en évidence des différences entre les effets temporaires et ainsi permettre d'établir des relations satisfaisantes entre les réponses animales lors des restrictions alimentaires partielles et leur efficacité alimentaire. Les techniques des prélèvements qui seront utilisées sont des pratiques couramment appliqués dans des élevages ne nécessitant pas une contention particulière. Les vaches sont immobilisées par blocage du cornadis et les opérateurs sont expérimentés et maîtrisent les techniques. L'évaluation de la gêne ou éventuellement de la douleur générée par les techniques de prélèvement est faite par observation du comportement des animaux. Si ces observations mettent en évidence une perturbation de l'animal pendant la procédure, celle-ci sera arrêtée. Si le stress persiste, on fera appel à un vétérinaire praticien.

Les objectifs de ce travail sont au nombre de quatre.

- Objectif 1 : Mesurer la variabilité, entre individus, des réponses à des perturbations. La variabilité des réponses sera évaluée au cours, i) de la période de fin de gestation et début de la lactation (notamment chez la vache laitière pour qui cette période est sensible), ii) d'un challenge nutritionnel expérimental qui interviendra après le pic de lactation à un moment où les vaches ont à nouveau la capacité d'ingérer suffisamment pour couvrir leurs besoins nutritionnels et iii) d'un challenge répété, enchainant trois périodes de déficit alimentaire courts en milieu de lactation.

- Objectif 2 : Analyser et comparer les réponses animales de chaque challenge entres elles.

- Objectif 3 : Déterminer si l'enchainement de 3 perturbations consécutives induit des effets cumulatifs sur les réponses animales.

- Objectif 4 : Déterminer si la diversité des réponses entre les individus est associée avec des différences d'efficacité d'utilisation des aliments.

Ce travail s'inscrit dans un projet de recherches européen qui a pour objectifs de 1/ caractériser et quantifier les interrelations entre la robustesse des animaux et la capacité à produire viande et lait, et 2/ comparer les réponses dans différents environnements de production en utilisant des approches innovantes et de nouvelles mesures.

13248 Le diabète de type 2 (DT2) et la maladie d'Alzheimer (MA) sont des pathologies dégénératives liées à l'âge et à prévalence croissante en raison du vieillissement de la population.

Les études épidémiologiques ont montré que le Diabète de type 2 (DT2) augmente le risque de développer une démence, des troubles cognitifs et la MA. Cependant, malgré les nombreuses observations qui lient DT2 et MA, les mécanismes moléculaire et cellulaire impliqués dans l'association de ces deux pathologies restent inconnus.

La compréhension de ces mécanismes est un élément crucial pour décoder cette relation et pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques communes pour lutter contre ces deux maladies.

Aussi afin d'étudier le lien entre ces deux maladies, nous allons analyser les éventuelles modifications dans l'expression de plusieurs biomarqueurs de la MA chez un modèle animal de DT2, le rat Goto-Kakizaki (GK).

Notre approche est basée principalement sur le dosage des biomarqueurs d'intérêt dans des prélèvements de liquide céphalorachidien (LCR) et de plasma. Ces prélèvements seront réalisés, de manière longitudinale, à différentes étapes de la vie du rat.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 40 rats, sur une durée de 2 ans.

Nous veillerons au respect de la règle des 3R par :

Le raffinement de nos procédures afin de réduire au mieux l'inconfort et la souffrance des animaux (anesthésie, antalgie en post opératoire). La qualité de l'environnement d'hébergement des animaux sera aussi surveillée.

La réduction du nombre d'animaux sera affinée grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant une fiabilité des résultats entre les différents groupes pour un $n=10$.

Le remplacement des modèles animaux pour cette étude des biomarqueurs ne peut cependant pas être réalisé par modèles *in vitro*.

13249 Hormis les carences alimentaires en acides aminés, les tissus doivent faire face à d'autres situations conduisant à des réductions de la biodisponibilité en certains acides aminés qui peuvent être fortement préjudiciables, notamment pour les individus âgés, en favorisant la fonte musculaire. Des résultats récents montrent qu'un traitement chronique au paracétamol, médicament largement utilisé par les personnes âgées, induit une fonte musculaire chez le rat. Cet effet peut, en partie, être expliqué par la réduction de la biodisponibilité de la cystéine pour le muscle, consécutive au processus de détoxication du médicament. La détoxication du paracétamol a en effet lieu dans le foie, où elle est consommatrice de cystéine via le sulfate et le glutathion (tripeptide dont l'acide aminé limitant sa synthèse est la cystéine). Ainsi, la détoxication du paracétamol s'accompagne d'une réduction de la concentration en glutathion, non seulement dans le foie, mais également dans d'autres tissus comme le muscle.

Par ailleurs, dans le cadre de l'étude des mécanismes d'adaptation à un stress nutritionnel chez les mammifères, les chercheurs ont démontré, dans des cellules en culture, le rôle clé joué par la voie de signalisation GCN2/eIF2 α /ATF4 dans le processus d'adaptation à une carence en acides aminés. Par la suite, ils ont validé la fonctionnalité de cette voie (et de la kinase GCN2) chez la souris en réponse à la consommation d'un repas carencé en un acide aminé indispensable. Afin de pouvoir étudier le rôle joué par cette voie de signalisation au niveau de l'animal entier, une lignée de souris transgénique AARE-LUC qui exprime le gène rapporteur luciférase (LUC) sous le contrôle de séquences de fixation du facteur de transcription ATF4 a récemment été généré et breveté. En mesurant le niveau d'expression du gène rapporteur, cette lignée de souris AARE-LUC permet d'étudier au niveau de chaque tissu (par imagerie bioluminescente) et au niveau de chaque cellule (par histologie) l'activation de la voie eIF2 α /ATF4, en fonction de situations nutritionnelles ou physiopathologiques. L'utilisation d'un appareil capable de réaliser des images bioluminescentes a récemment permis de visualiser le profil d'activation de la voie GCN2/eIF2 α /ATF4 dans certains tissus, comme le foie, le pancréas et le cerveau, lors de la consommation d'un régime carencé en un acide aminé indispensable.

De plus, le traitement au paracétamol peut générer un stress oxydant au niveau cellulaire, qui est connu pour activer la voie eIF2 α /ATF4. Le facteur de transcription ATF4 a été décrit comme

exerçant un rôle dans la fonte musculaire consécutive à un état hyper-catabolique (jeûne prolongé, plâtrage d'un membre...).

L'objectif du projet est de déterminer l'apport optimal en acides aminés soufrés lors de traitement chronique au paracétamol induisant une perte de masse musculaire en utilisant la lignée de souris transgénique AARE-LUC.

Ce projet va nécessiter 80 souris (2 expériences de 40 souris) et sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE.

Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner), utilisant des conditions de stabulation, de bien-être animal et un nombre de souris optimisés. Il n'est pas possible de remplacer le modèle *in vivo* dans le cadre de ce projet. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu (réduction, raffinement). Une observation journalière des animaux est assurée par la personne chargée de l'expérimentation. Cette observation consiste à vérifier l'état et le comportement général des souris. Des points limites adaptés à l'expérience seront mis en place : une perte de poids corporel supérieure à 25 %, un refus de s'alimenter pendant plus de 3 jours, un poil hérissé, une locomotion modifiée ou l'absence de comportement de toilettage. Ils impliqueront l'exclusion des souris du protocole. Ces souris seront ré-alimentées avec le régime standard et si elles retrouvent un bon état de santé, elles seront remises dans l'élevage de la lignée afin de pouvoir être utilisées ultérieurement pour un autre protocole expérimental. Par ailleurs, lors des procédures expérimentales (imagerie), les souris seront placées sous anesthésie générale afin d'éliminer toute douleur potentielle et de réduire l'angoisse générée par la manipulation.

13250 L'obésité et le diabète sont associés à une augmentation du risque de cancer du pancréas mais leur contribution relative dans les phases précoces du cancer du pancréas est peu connue.

De plus, contrairement au foie ou au colon, il est impossible de faire des biopsies du pancréas pour vérifier son état.

Aussi des méthodes d'analyses non invasives de type Imagerie (dont l'imagerie par résonance magnétique IRM) sont recherchées.

Chez des rats obèses et/ou diabétiques, nous voulons :

- caractériser les différentes phases de l'évolution du cancer du pancréas : de l'infiltration adipeuse à la fibrose puis au cancer,
- développer des outils d'imagerie *in vivo* adaptés pour suivre cette évolution,
- tester l'effet de traitements afin de ralentir ou prévenir le cancer du pancréas.

La chirurgie bariatrique est aujourd'hui le seul traitement permettant une perte de poids suffisante sur le long terme et un contrôle des comorbidités induites par l'obésité. La sleeve gastrectomie (SG), qui est une réduction de la taille de l'estomac, est actuellement la procédure la plus pratiquée en France et dans les pays occidentaux. Les conséquences de cette opération sur la résolution du diabète sont bien connues, en revanche son effet bénéfique sur le cancer du pancréas lié à l'obésité reste à être démontré.

Nous avons 2 objectifs :

1- comparer l'histologie *ex vivo* et l'imagerie *in vivo* par IRM du pancréas de rats obèses et/ou diabétiques.

2- comparer l'impact d'un traitement chirurgical de type SG par rapport à un traitement pharmaceutique.

Au final, ce projet nécessitera l'utilisation de 220 rats Wistar et 220 rats GK (un modèle de rat diabétique) sur 5 ans.

Tous les animaux seront mis à mort, après la réalisation de l'IRM à la fin du projet.

A terme ce projet pourrait permettre d'identifier et traiter les lésions précancéreuses chez les patients obèses et/ou diabétiques à risque, avant le développement du cancer du pancréas.

Remplacement : Notre projet correspond à un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes et les régulations métaboliques entre l'intestin et le pancréas. Quelques modèles cellulaires, en particulier les organoïdes issus d'intestin ou de pancréas, peuvent permettre d'étudier les communications entre les différents types de cellules au sein d'un organe, mais aucun modèle aujourd'hui ne permet de reproduire les interactions inter-organes. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux (n=20) par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et valorisables ou publiables. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Ce projet vise à valider de l'imagerie *in vivo* par IRM pour pouvoir réaliser des études longitudinales chez les animaux et ainsi largement réduire les effectifs.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant pendant et après l'opération. La persistance au-delà de 24h de signaux de souffrance entraînera l'euthanasie de l'animal. Nous avons inclus dans les procédures des grilles de suivi de poids et de la prise alimentaire des animaux avec des pesées hebdomadaires depuis le début des traitements et journalières après la chirurgie.

Nous avons défini une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites précis.

13251 Le traitement actuel des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) n'est pas satisfaisant de par sa faible efficacité, sa haute toxicité et sa longue durée. Le traitement des MNT dépend aussi de l'espèce : pour *Mycobacterium avium*, il consiste en l'administration de plusieurs antibiotiques qui doivent être pris pendant 12 à 24 mois ; pour *Mycobacterium abscessus*, naturellement résistante à certains antibiotiques, le traitement implique des injections intraveineuses prolongées. Ces différents facteurs engendrent des problèmes de suivi de traitement qui vont conduire à l'émergence de souches résistantes.

Notre projet « Etude pré-clinique de nouveaux composés actifs contre les MNT » consiste à étudier l'activité de nouveaux antibiotiques contre les MNT dans le modèle murin. En respect de la règle des 3R, les composés les plus actifs contre les MNT seront sélectionnés *in vitro* car seuls les composés les plus efficaces seront testés *in vivo* dans le modèle murin (remplacement).

Les animaux seront infectés par voie intraveineuse par une souche de *M. avium* ou *M. abscessus* puis traités par voie orale ou sous-cutanée. Les critères de jugement d'efficacité des composés seront la survie des animaux traités comparée aux témoins non traités et la charge bacillaire pulmonaire en fin de traitement comparée à celle du premier jour du traitement.

La 1ère expérience consiste à déterminer la dose minimale effective des meilleurs composés actifs sur les MNT chez les souris. Des souris BALB/C/J seront comparées à des souris NUDE. Ces deux lignées permettront d'obtenir différentes informations sur l'activité des composés. Cette comparaison nous permettra de choisir la lignée la plus efficace pour la suite du projet (réduction). 6 souris sont nécessaires par groupe. Le groupe témoin non traité sera sacrifié le jour du début de traitement pour estimer la charge bacillaire de départ ; 6 souris sacrifiées après 2 semaines de traitement ; et 6 souris sacrifiées à la fin de la période de traitement d'un mois (18 souris). Les groupes traités seront sacrifiés après 2 semaines et 1 mois de traitement. 6 souris par posologie soit 60 souris par composé et 12 souris traitées par l'antibiotique de référence. Nous estimons qu'au maximum 9 composés seront testés pour un total de 570 souris. Cette expérience sera réalisée sur 2 mycobactéries (*M. avium* et *M. abscessus*) et dans 2 lignées (BALB/C et Nude) soit un total 2280 souris au maximum.

La 2ème expérience consistera à évaluer l'activité bactéricide des nouveaux composés en association. La lignée de souris choisie (BALB/C/J ou NUDE) dépendra des résultats obtenus dans l'expérience 1. Au maximum 4 composés sélectionnés lors de l'expérience 1 seront évalués. Chaque nouvelle molécule sera testée en bithérapie avec un antimycobactérien existant (1er test)

ou entre elles (2ème test) ou en association avec 3 ou 4 antibiotiques (3ème test). Le traitement durera 1 mois. 10 souris par groupe sont nécessaires.

Pour le premier test, 10 souris sont nécessaires par groupe. Le groupe témoin non traité sera constitué de 10 souris et sacrifié le jour du début de traitement pour estimer la charge bacillaire de départ ; 10 souris sacrifiées après 2 semaines de traitement ; et 10 souris sacrifiées à la fin de la période de traitement (1 mois) (30 souris au total). Les groupes traités seront sacrifiés après 2 semaines et 1 mois de traitement. 10 souris sont nécessaires par antibiotique testé (de référence et nouveau composé) soit 20 souris par groupe. Pour une expérience, 4 antimycobactériens existants seront testés et 1 nouveau composé en monothérapie (soit 100 souris) puis en association les uns avec les autres (soit 80 souris). Au total pour un composé testé, pour une espèce bactérienne, 210 souris sont nécessaires. 2 espèces bactériennes seront testées soit 420 souris et l'expérience pourra être menée au maximum sur 4 nouveaux composés, soit un total de 1680 souris.

Pour le deuxième test, 10 souris sont nécessaires par groupe. Le groupe témoin non traité sera constitué de 10 souris qui seront sacrifiées le jour du début de traitement pour estimer la charge bacillaire de départ ; 10 souris sacrifiées après 2 semaines de traitement ; et 10 souris sacrifiées à la fin de la période de traitement d'un mois (30 souris au total). Les groupes traités seront sacrifiés après 2 semaines et 1 mois de traitement. 10 souris sont nécessaires par nouveau composé testé soit 20 souris par groupe. Pour une expérience, les 4 nouveaux composés les plus actifs (sélectionnés en fonction des expériences précédentes) en monothérapie (soit 80 souris) puis en association les uns avec les autres (soit 120 souris). Au total pour une espèce bactérienne, 230 souris sont nécessaires. 2 espèces bactériennes seront testées soit 460 souris.

Pour le troisième test, 10 souris sont nécessaires par groupe. Le groupe témoin non traité sera constitué de 10 souris qui seront sacrifiées le jour du début de traitement pour estimer la charge bacillaire de départ ; 10 souris sacrifiées après 2 semaines de traitement ; et 10 souris sacrifiées à la fin de la période de traitement d'un mois (30 souris au total). Les groupes traités seront sacrifiés après 2 semaines et 1 mois de traitement. 10 souris sont nécessaires par nouveau composé testé soit 20 souris par groupe. 6 trithérapies ou quadrithérapies seront testées incluant les nouveaux composés les plus actifs en comparaison avec le traitement de référence (soit 140 souris). Au total pour une espèce bactérienne, 170 souris sont nécessaires. 2 espèces bactériennes seront testées soit 340 souris.

Au total, 4760 souris sont nécessaires pour ces évaluations.

L'observation matin et soir 7 jours/7 des animaux permet d'observer si un changement dans leur comportement habituel intervient (animal prostré, ne se nourrissant plus, poil piqué, ne se servant plus de l'enrichissement mis à sa disposition). Cette surveillance permet de détecter une éventuelle souffrance. Les paramètres sont suivis dans le cahier de laboratoire et si un changement intervient dans l'un de ces paramètres, la modification y est indiquée et l'animal est euthanasié par élongation cervicale (raffinement).

13252 L'objectif de notre étude est de démontrer que le microbiote intestinal (les bactéries localisées au sein de notre intestin) participe à l'amélioration du diabète de type 2 observée après chirurgie bariatrique. Pour ce faire, nous comptons réaliser des expériences de transplantations de fèces de patients ayant eu une chirurgie bariatrique et qui étaient atteints d'un diabète de type 2 avant l'opération.

Quatre patients en rémission complète (critères diagnostiques du DT2 normaux) ainsi que 4 patients restés diabétiques après leur chirurgie seront sélectionnés sur la base de leurs profils cliniques (perte de poids, amélioration de la glycémie, etc) et métagénomique (composition de leur microbiote en termes de type de bactéries). Un groupe de 4 patients opérés mais n'ayant jamais été atteint de diabète sera aussi constitué en tant que groupe « contrôle ». Compte tenu de la variabilité importante de la composition du microbiote intestinal des patients, un nombre total de 12 patients (dont 4 contrôles) est adapté afin d'obtenir des résultats comparables et une puissance statistique satisfaisante.

Le transfert sera réalisé à partir des selles collectées 5 ans après la chirurgie et préparée de manière standardisée en solution contenant des antioxydants et du glycérol (afin de favoriser la survie des bactéries notamment anaérobies) puis stockées à -80°C. Le transfert de microbiote humain chez la souris sera réalisé selon un protocole récemment mis au point dans notre laboratoire, à savoir la souris conventionnelle juste sevrée (3 semaines d'âge) ayant été prétraitée par un cocktail antibiotique à large spectre (ampicilline, néomycine, métronidazole) afin de favoriser l'implantation du microbiote humain. Pour chaque condition expérimentale (rémission vs non-rémission vs non-diabétique), des groupes de 10 souris seront constitués, ce qui fait un total de 120 souris. Les transplantations seront réalisées par groupes de 6 patients (donc 2 expériences consécutives de 60 souris) pour lesquelles un groupe de 6 souris « contrôle » non-inoculées sera aussi constitué. Le nombre total d'animaux prévu est ainsi de 132 souris ($[10 \times 6 + 6] \times 2$).

Vis à vis de la règle des 3R, ceci correspond au nombre minimal de groupes et de souris nécessaires afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et statistiquement fiables. 10 souris par groupe est le nombre minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétables, compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés (poids, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline) et de l'implantation du microbiote intestinal humain. En ce qui concerne le raffinement du protocole, l'ensemble des manipulations effectuées sur les animaux sont de classe légère à modérée. Nous prendrons soin de les faire exécuter par des personnes expérimentées et compétentes afin de réduire la sévérité et l'intensité de la douleur, ainsi que le stress généré au maximum. Nous avons également choisi un matériel et des procédures adéquats pour limiter la douleur et le stress, avec en particulier l'utilisation des sondes de gavage en plastique fines et souples. Un suivi hebdomadaire de prise alimentaire et du poids sera réalisé, ce qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux ainsi que de les habituer aux manipulations et ainsi de générer moins de stress lors des procédures ultérieures (tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline). De plus, un laps de temps de minimum 2 semaines entre les procédures de classe modérée sera respecté afin de laisser un temps de récupération aux animaux. L'utilisation d'autre modèle que l'in-vivo (tel que l'intestin in-vitro) n'est pas adaptée à l'étude causale de l'implication du microbiote intestinal dans les processus physiopathologiques (inflammation, insulino-résistance, immunité) liés au diabète de type 2 et sa résolution.

Après l'inoculation du microbiote humains au sein des différentes conditions, nous allons évaluer la qualité du transfert de microbiote ainsi que les interactions entre la souris hôte et son microbiote. La qualité du transfert est tout d'abord évaluée par le degré de similarité entre la composition du microbiote des patients et celle de celui des souris receveuses. Nous allons donc prélever les fèces des souris plusieurs fois au long de l'expérience et analyser la composition de leur microbiote par séquençage haut débit (par la technologie du nanopore (MinION) développée par Oxford Nanopore et mis en place au sein du laboratoire). Le deuxième critère de réussite du transfert de microbiote est la genèse d'altérations métaboliques chez la souris receveuse.

Pour évaluer l'altération métabolique des receveuses nous allons suivre leur prise de poids durant 10 semaines en les pesant 2 fois par semaine et en mesurant leur prise alimentaire. Au sacrifice leurs tissus adipeux (épididymal, inguinal, mésentérique et périrénal) seront prélevés et pesés afin d'évaluer leur niveau d'obésité. D'un point de vue du métabolisme glucidique, des techniques classiques telles que les tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline seront utilisées en suivant les méthodes recommandées par la littérature. Les métabolites circulants sont une des méthodes permettant de faire le lien entre altérations métaboliques et microbiote intestinal. Ainsi, le métabolome circulant sera analysé en fin d'expérimentation pour explorer la causalité entre les altérations métaboliques observées et le microbiote intestinal.

13253 L'objectif du projet est de mettre en place des stratégies thérapeutiques innovantes qui soient efficaces et sans effets secondaires notables pour les patients. Pour ce faire, l'étude est focalisée sur des petites molécules et fragments de protéines appelés « peptides » qui ciblent spécifiquement des dérèglements moléculaires et cellulaires liés à la pathologie. Les outils thérapeutiques

(molécules et peptides) ne doivent pas affecter les circuits moléculaires et cellulaires de la cellule normale. Ils ne doivent pas altérer l'état général des individus sains.

Récemment, un peptide a été découvert et il possède toutes les caractéristiques requises de sécurité et d'efficacité dans le cadre d'une maladie du système immunitaire appelée lupus érythémateux disséminé qui est une maladie inflammatoire chronique. Ce peptide est actuellement évalué au niveau mondial dans un essai clinique avancé de phase III chez des patients atteints de lupus.

De plus, des résultats préliminaires ont montré que ce peptide pouvait être efficace dans d'autres maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RH). L'objectif de l'étude est d'élargir l'analyse des effets thérapeutiques de ce peptide à un autre modèle de maladie inflammatoire de l'intestin, la colite, qui sera chimiquement induite chez l'animal.

Tout au long du projet, toutes les mesures seront prises afin de respecter au mieux la règle des 3R et garantir ainsi le bien-être animal.

-Remplacer : ces études ne peuvent pas être réalisées *ex vivo* car l'efficacité du peptide-médicament testé fait intervenir plusieurs systèmes multi-intégrés de l'organisme (microbiote intestinal, système immunitaire, ...) que l'on ne peut pas récapituler à ce jour dans des modèles cellulaires artificiels. De plus, ces travaux entrent dans une stratégie préclinique qui devrait aboutir à l'exécution d'essais cliniques qui requiert de réaliser des évaluations chez l'animal entier pour constituer les dossiers de demandes d'autorisations d'essais cliniques auprès des Autorités.

-Réduire : le nombre d'animaux a été évalué à 10 par groupe (simulation statistique de validité de ces petits effectifs) pour garantir la validité statistique des résultats. Au total, nous utiliserons au maximum 326 souris sur 5 ans.

-Raffiner : Les animaux seront maintenus en groupe sociaux dans des cages enrichies (matériel de nidation, bâtons à ronger). Le peptide à tester sera administré sous anesthésie afin de limiter la douleur liée à la procédure. Suite à la mise en place du modèle de colite, les animaux seront suivis quotidiennement et la douleur sera évaluée grâce à une grille de scoring objectivée. Des points limites prédictifs basés sur le suivi clinique des animaux ont été établis permettant de soustraire l'animal des procédures à tout moment, limitant ainsi le stress et la souffrance induits.

13254 Le cancer du sein est le cancer féminin le plus diagnostiqué en France et dans le monde.

Avec environ 54 000 nouveaux cas et 12 000 décès par an, le cancer du sein se situe au 2^e rang des cancers et au 3^e rang de la mortalité par cancer.

La prise en charge globale impose dans approximativement 30 % des cas une mastectomie totale en première intention, augmentant annuellement de 18000 le nombre de femmes françaises susceptibles de bénéficier d'une reconstruction mammaire. La reconstruction mammaire restaure un volume après mastectomie partielle ou totale, soit de manière immédiate, dans le même temps opératoire que l'exérèse tumorale, soit de manière différée, en attendant un an après la fin des traitements adjuvants. Plusieurs traitements chirurgicaux peuvent être proposés : la plus connue est la prothèse de silicone qui reste un corps étranger qu'il faut changer régulièrement. L'alternative est le lipofilling : un remplissage progressif des zones délaîtées grâce à des cellules adipeuses provenant de la patiente. Cependant, la survie cellulaire ne dépasse pas 70 %, faute de vascularisation.

Le traitement peut également impliquer la mise en place d'une radiothérapie selon le type et le stade du cancer afin de diminuer le risque de rechute. La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en les empêchant de se multiplier. Elle consiste à diriger précisément ces rayons sur la zone à traiter, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants. Une radiothérapie est réalisée de préférence avant d'entreprendre une reconstruction du sein car de nombreuses études ont démontré qu'elle est à l'origine d'une augmentation des problèmes liés à la reconstruction (infection ; contracture capsulaire, nécrose). Dans ce cas, la reconstruction est généralement différée.

Notre but est d'améliorer la méthode actuelle de reconstruction, en créant une structure transitoire associant tissu autologue et matière synthétique, ne nécessitant qu'une seule intervention « définitive ». Dans cette optique, une matrice tridimensionnelle en polymère résorbable constituée d'un dôme et d'un socle a été développée afin d'y insérer un lambeau adipeux vascularisé. Une fois la matrice implantée, le lambeau va croître jusqu'à remplir l'espace défini par le dôme tandis que la matrice se résorbe. Il s'agit d'un projet susceptible d'apporter une innovation majeure dans l'arsenal thérapeutique actuel de la chirurgie plastique et reconstructrice et de changer la pratique à l'échelle mondiale. Des études précédentes ont montré l'efficacité de notre technique sur animal sain et non irradié.

L'objectif de ce projet est de définir l'impact des rayons ionisants sur la croissance du lambeau adipeux et sur les propriétés physicochimiques du polymère constituant la matrice afin déterminer si notre technique de reconstruction peut être effectuée conjointement à un traitement par radiothérapie ce qui constituerait un avantage pour les patientes.

Pour cela, une étude sera menée sur 51 rats Wistar. 3 groupes seront constitués : un groupe témoin positif qui sera irradié mais non implanté, un groupe irradié pendant 3 semaines puis implanté et un groupe implanté puis irradié pendant 3 semaines. Les implantations se feront chirurgicalement sous anesthésie générale et condition d'asepsies strictes par des personnes qualifiées. Les animaux seront suivis quotidiennement pour détecter et traiter tout signe de douleur.

L'évolution du tissu dans la chambre prothétique sera suivie par IRM sous anesthésie, durant 1 an, afin de déterminer la cinétique de croissance du lambeau adipeux mais également la cinétique de résorption de la prothèse.

Des prises de sang seront également réalisées une fois par mois afin de suivre l'inflammation systémique pouvant être engendrée.

2 animaux par groupes seront également explantés à 1 mois, 3 mois, 6 mois, 9 mois et 1 an pour suivre l'état de dégradation de la prothèse et réaliser des analyses histologiques intermédiaires.

Le projet a été établi en respectant la règle des "3R" :

Le REMPLACEMENT : Le modèle animal est essentiel pour cette étude car il nous permet d'observer la croissance du lambeau adipeux *in vivo* et de tester l'impact de la radiothérapie avant de passer chez l'humain. Il nous permet également d'acquérir des connaissances sur la dégradation du polymère, la toxicité et les effets secondaires. Ces données ne peuvent être obtenues que par l'implantation du dispositif *in vivo*.

La REDUCTION : nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux utilisés afin d'obtenir des tracés suffisamment précis pour être exploitables et permettre la mise en évidence des différences de traitements. Les animaux du groupe témoin positif (irradiés non implantés) seront utilisés pour mettre au point la technique d'irradiation. La technique de suture des animaux sera constamment améliorée afin de diminuer les risques de rupture et donc de souffrance et de perte d'animaux.

Le RAFFINEMENT a été au cœur de l'élaboration du projet avec notamment la détermination des points limites et l'optimisation de l'hébergement en lien avec le responsable du bien-être animal de l'établissement. Grâce à une bonne prise en charge de la douleur, aucun test chez l'animal n'est douloureux au sens réglementaire du terme, c'est-à-dire qu'aucun geste n'a de répercussions supérieures à celles induites par une aiguille sous cutanée.

13255 La douleur est définie par l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP) comme une « expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite dans ces termes ». On en distingue communément quatre composantes : (i) sensori-discriminative, c'est-à-dire le décodage du message douloureux (qualité, durée, intensité...), (ii) affectivo-émotionnelle (anxiété, dépression...), (iii) cognitive, à savoir la signification donnée à la douleur et sa mémorisation (iv) comportementale, soit l'expression motrice, verbale et le retentissement végétatif. L'étude de la douleur et des mécanismes qui la sous-tendent est indispensable afin de permettre l'élaboration de nouveaux traitements antalgiques, la douleur étant à l'origine de près de deux tiers des consultations médicales.

A l'heure actuelle, l'évaluation des symptômes douloureux dans des modèles animaux se fait majoritairement par le biais de tests nociceptifs. Ceux-ci rendent compte de la composante sensorio-discriminative de la douleur par la mesure du seuil d'apparition d'un comportement d'évitement face à un stimulus nociceptif. Ces tests, principalement basés sur des réponses réflexes, ne permettent pas d'évaluer les autres composantes de la douleur. Celles-ci sont pourtant au cœur des préoccupations de notre société actuelle, les douleurs chroniques impactant négativement le comportement et le bien-être du patient (troubles de l'appétit, troubles de l'humeur, troubles cognitifs...). Ces comorbidités peuvent cependant seulement être évaluées indirectement chez l'animal, par le biais de batteries de tests comportementaux indépendants qui ne sont pas spécifiques au contexte des douleurs chroniques. Ce projet présente donc un intérêt double : (i) favoriser la mesure de la douleur dans l'intégralité de ses composantes afin d'améliorer la portée des recherches et la prise en charge des patients douloureux, et (ii) raffiner les procédures actuelles d'évaluation de la douleur afin de pouvoir limiter l'exposition des animaux aux tests comportementaux.

Ce projet, d'une durée de cinq ans, vise à caractériser un nouveau test comportemental d'évaluation de la douleur chez les modèles expérimentaux murins : le test d'évitement de l'inconfort sensorio-affectif (SADA – sensory-affective discomfort avoidance). Ce test innovant est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour les zones éclairées, combinée à un paradigme de rampe de température, duquel l'animal peut s'échapper à tout moment. Les différents paramètres qui peuvent en être extraits permettent de mesurer les quatre composantes de la douleur grâce à un test unique, raffinant ainsi les procédures actuellement utilisées en laboratoire.

Les tests seront tout d'abord réalisés chez des animaux contrôles (naïfs) mâles et femelles, afin de déterminer les paramètres de base et ainsi calibrer le test de façon optimale. Ensuite, le test sera réalisé dans deux modèles de douleur communément utilisés à travers le monde : un modèle de sensibilisation inflammatoire induite par une injection intraplantaire de CFA (adjuvant de Freund) et un modèle de neuropathie par compression du nerf sciatique. Afin de discriminer les paramètres permettant l'évaluation de chacune des quatre composantes de la douleur, chaque groupe d'animaux recevra un traitement pharmacologique différent agissant sur un aspect spécifique de la douleur. Les interventions chirurgicales invasives seront réalisées sous anesthésie générale et en conditions d'asepsie. La température corporelle de l'animal sera maintenue constante à l'aide d'un matelas chauffant thermostaté. Un anesthésique local n'impliquant pas de conséquence à long terme sera également injecté avant de procéder aux procédures invasives. Un suivi postopératoire sera réalisé quotidiennement afin d'être en alerte en cas de dégradation du bien-être animal. Ici, un traitement antalgique ne peut pas être administré puisque les symptômes douloureux sont le paramètre qui est étudié.

Un nombre de rats égal à 480 est nécessaire pour réaliser l'étude. Afin de tenir compte de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), le nombre d'animaux par lot a été estimé sur la base des analyses statistiques à réaliser et du seuil de significativité qu'elles requièrent. Des groupes de 10 animaux permettront d'objectiver des différences significatives supérieures à 20% lors de l'utilisation de tests non paramétriques (R : réduire). Les animaux sont hébergés en cage collective pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères. Les cages sont également enrichies avec un bâton de bois à ronger. Les modèles de douleur seront induits sous anesthésie générale et un suivi post opératoire sera ensuite réalisé quotidiennement. Des points limites ont également été définis afin de limiter la souffrance de l'animal (R : raffiner). La modélisation de la douleur neuropathique ou de la sensibilisation inflammatoire nécessitent la présence d'un réseau nerveux complet, et ces modèles ne peuvent être obtenus à ce jour que grâce à l'animal. De plus, le test utilisé ici vise à raffiner les tests comportementaux et nociceptifs actuellement utilisés en laboratoire (R : remplacer).

13256 Ce projet vise à étudier *in vivo* l'adhésion gingivale autour du col des implants dentaires. L'étanchéité entre l'épithélium et le col a été identifiée comme le facteur déterminant pour prévenir l'inflammation péri-implantaire qui entraîne la perte de l'implant.

Par des études *in vitro* nous avons mis en évidence un nouveau type de traitement de la surface implantaire qui augmente l'adhésion de la gencive sur l'implant (remplacement). Le but de ce projet est d'évaluer *in-vivo* ce nouveau type de traitement de surface.

L'animal choisi pour la pose des implants dentaires est le rat (*Rattus Norvegicus*). Il s'agit d'une méthode d'implantation immédiate utilisée chez l'homme. Après l'extraction de la première molaire du rat et la préparation consécutive de l'alvéole, on met en place un implant adapté pour cet animal. Pour cette étude 38 animaux seront nécessaires pour les deux périodes d'implantation (4 et 16 semaines). L'analyse statistique a démontré qu'un nombre de 6 rats/groupe sera optimal pour avoir des résultats avec une puissance de 80% (réduction).

Un suivi post - opératoire sera réalisé pour éviter toute souffrance de l'animal, accompagné par un enrichissement spécifique pour diminuer son angoisse. Une diète adaptée sera appliquée jusqu'au sacrifice de l'animal. Enrichissement adapté pour réduire l'intensité de la lumière dans les cages des animaux et augmenter leur sensation de sûreté et invisibilité sera utilisé (raffinement). En cas de perte d'implant cet animal pourra être utilisé dans une autre expérimentation animale. Les résultats favorables de cette étude *in-vivo* nous rapprochera vers l'application de cette méthode de fonctionnalisation de la surface implantaire chez l'homme.

(Enrichissement : Car ball Ambre (Carfil Labofood) - réduit l'intensité de la lumière et fournit un sentiment d'invisibilité et de sûreté.)

13257 Le cancer colorectal (CCR) est le 3ème cancer par sa fréquence tous sexes confondus derrière les cancers du sein et de la prostate et le 2ème le plus meurtrier (17000 décès annuels) après le cancer du poumon. Selon l'INCa, 40500 nouveaux cas de CCR sont déclarés en France par an avec une augmentation estimée de près de 45000 nouveaux cas annuels à partir de 2020. Des patients atteints de désordres métaboliques montrent non seulement un risque accru de développer un CCR mais également une résistance plus forte au traitement par le 5-Fluorouracile (5-FU), chimiothérapie de référence du CCR avancé et métastatique. Une étude clinique menée en 2012 a établi une corrélation entre la mortalité par CCR au stade III, la récurrence après traitement au 5-FU et l'apport nutritionnel riche en glucides. Il a été également montré que les colons de souris nourries avec des régimes riches en glucides présentaient des quantités plus élevées de O-GlcNAcylation par rapport aux souris nourries avec un régime standard soutenant l'hypothèse selon laquelle des troubles nutritionnels, même de courte durée, pourraient prédisposer à l'émergence du CCR via une perturbation de la dynamique de O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle de protéines impliquées dans divers processus biologiques (cycle cellulaire, apoptose, signalisation, réponse au stress, développement embryonnaire etc.).

Les objectifs de ce projet seront de conforter, sur des modèles *in vivo*, des résultats obtenus *in vitro* et d'identifier des cibles moléculaires en travaillant de front sur deux modèles biologiques : lignées coliques cancéreuses, souris obèses ob/ob versus C57Bl6/J chez lesquelles nous induirons des tumeurs coliques. Les tumeurs coliques seront induites chimiquement et suivies par coloscopie chez des souris soumises à un régime normal ou riche en sucres (High Carbohydrates Diet: HCD).

Afin de veiller au bien être de l'animal et respecter les 3R, toutes les manipulations seront réalisées par un personnel formé aux techniques et à l'éthique animale. Les animaux seront hébergés dans des conditions favorables à leur bien être (cycle jour/nuit 12h/12h, nourriture et eau ad libitum, cages avec tunnel et nid de cellulose). Ils seront manipulés (pesée, 1 injection, coloscopie et pause de pompe Alzet) dans une pièce dédiée et séparée de la pièce d'hébergement.

Pour l'ensemble de ce projet, nous aurons besoin de 150 souris que la culture cellulaire ne peut remplacer. L'association des deux équipes partenaires du projet et le partage des échantillons nous permettra de réduire considérablement le nombre nécessaire de souris.

13258 L'ischémie-Reperfusion des membres inférieurs est un problème de santé publique, causant des dommages irréversibles aux tissus voire à l'organisme entier et mettant en jeu le pronostic vital. L'ischémie se caractérise par un manque d'oxygénation d'un tissu, secondaire à une interruption de la circulation sanguine au niveau d'une artère. La reperfusion, nécessaire pour sauver le membre

s'accompagne cependant d'une majoration des atteintes musculaires (atteinte des mitochondries, centrales énergétiques de la cellule), attribuée surtout à la libération des radicaux libres. Cette situation est très fréquente dans la pratique de la chirurgie vasculaire au cours de laquelle le clamp artériel induit une ischémie, suivie d'une reperfusion lors du déclantage.

La recherche de stratégies en vue de la protection des muscles et des organes, notamment permettant de réduire les dysfonctions mitochondriales post-ischémie-reperfusion, est un des défis à relever. Une équipe de recherche a montré qu'en inhibant l'activation de la protéine eIF5A dans le rein, les mitochondries diminuaient leur métabolisme, et de ce fait protégeait le rein d'une ischémie. L'eIF5A est une protéine ubiquitaire qui intervient dans la prolifération cellulaire.

Notre objectif est de vérifier si cette protection sur le rein est transposable au muscle squelettique. Le présent projet sera réalisé avec 40 souris.

La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration des procédures. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible car les altérations des tissus cibles lors de l'ischémie-reperfusion sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme.

La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques. Ainsi, nous avons vérifié au préalable que la patte controlatérale pouvait servir de témoin dans ce modèle d'ischémie-reperfusion unilatérale, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux participant au travail tout en conservant la puissance statistique nécessaire.

Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (groupement des animaux pour éviter le stress dû à l'isolement, enrichissement du milieu dans la cage par ajout de coton et de morceau de bois et soins quotidiens aux animaux).

Les procédures seront réalisées sous anesthésie profonde et analgésie et la profondeur de l'anesthésie sera évaluée tout au long de la procédure.

13259 Il a été postulé que l'émergence des vertébrés a été rendue possible par l'acquisition de la crête neurale, qui en permettant le développement des structures complexes de la tête a conféré un avantage évolutif aux vertébrés. De ce point de vue, consécutivement à l'acquisition de la crête neurale il faut souligner la contribution cruciale au succès des vertébrés d'un dérivé de la crête neurale -la gaine de myéline-. En l'absence de cette structure, les vertébrés tel que nous les connaissons n'existeraient pas. Malheureusement, la destruction de cette gaine protectrice des axones dans certaines circonstances pathologiques, dont la plus fréquente est la Sclérose en plaques (SEP), a des conséquences dramatiques évoluant progressivement vers un handicap permanent.

Cette maladie neurologique a été décrite comme une entité nosologique en 1868 par JM Charcot. Le diagnostic repose essentiellement sur la clinique et l'imagerie médicale (IRM et PET). Il y a 40 ans on estimait en France le nombre de patients atteints de SEP à environ 50 000. Aujourd'hui les estimations épidémiologiques portent ce nombre à 100 000, soit un doublement en 40 ans qu'il est difficile d'attribuer uniquement à des progrès de nos critères diagnostiques. Plus troublant encore, alors que dès sa description initiale il avait été noté un franc déséquilibre du ratio lié au sexe (1/3 d'homme vs 2/3 de femme), deux études dans deux pays occidentaux différents font apparaître un ratio de 1/4 d'homme vs 3/4 de femme. Ces modifications des données épidémiologiques nous semblent étrangement corrélées avec l'augmentation dramatique au cours des 40 dernières années de Perturbateurs Endocriniens (PEN) dans notre quotidien. Corrélation n'étant pas démonstration, nous souhaitons examiner le rôle possible des PEN sur la myélinisation comme sur la réparation myélinique. Pour ce faire nous proposons d'utiliser un modèle vertébré d'étude *in vivo* de la myélinisation, le Xénope, chez lequel nous avons créé par transgénèse un modèle simple d'étude de la myélinisation. Ce Xénope transgénique présente l'avantage d'être aussi un modèle de démyélinisation conditionnel, qui nous permet d'étudier la remyélinisation. Notre projet se propose donc d'étudier l'effet de 35 PEN sur la myélinisation et la remyélinisation. La myélinisation comme la démyélinisation et la remyélinisation seront évaluées par comptage du nombre de cellules oligodendrogiales exprimant le transgène GFP fluorescent. De ce fait le comptage est réalisé sur

des têtards anesthésiés par comptage du nombre de cellules fluorescentes par nerf optique. Afin de respecter la règle des 3R nous favoriserons les accouplements naturels, plutôt que les fécondations *in vitro*, ce qui permet d'éviter d'avoir à prélever les testicules. Pour les expériences de criblage des PEN, nous limiterons au maximum le nombre d'animaux testés. Il faut à ce sujet remarquer que grâce à la transparence des têtards, et par comparaison avec d'autres espèces de vertébrés, nous pouvons suivre longitudinalement la myélinisation au cours du développement ainsi que la remyélinisation suite à une démyélinisation sur les mêmes animaux sans avoir à les sacrifier à chaque étape, ce qui serait nécessaire pour un suivi histologique. Nous estimons que pour chaque PEN il sera nécessaire de tester 15 têtards (10 PEN +5 contrôles) soit 525 pour les expériences de myélinisation. Un nombre identique est à prévoir pour les expériences de remyélinisation. En revanche, afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous ne testerons 4 différentes concentrations que pour les PEN pour lesquels nous détecterons pour une concentration un effet sur la myélinisation ou la remyélinisation. Ce nombre à ce stade est imprédictible, mais nous pouvons l'estimer à 10 PEN sur les 35 testés. Pour ces 10 PEN nous testerons 4 concentrations et 10 têtards par PEN soit 400 têtards plus 50 contrôles par PEN soit 450 têtards. Pour les tests comportementaux, (test d'évitement visuel), il est nécessaire de tester 30 têtards par condition. Gardant à l'esprit la règle des 3R, seules les PEN pour lesquels nous aurons mis en évidence un effet dans les tests de myélinisation et de remyélinisation seront testés dans ces expériences comportementales. Nous estimons que sur les 35 PEN seul 10 auront un effet sur la myélinisation et/ou la remyélinisation. La seule concentration utilisée sera celle pour laquelle nous aurons détecté l'effet sur la myélinisation ou remyélinisation le plus probant. Au total pour les conséquences sur le comportement d'un effet délétère sur la myélinisation nous testerons 300 têtards (30 x 10PEN) et de même pour la remyélinisation: 300 têtards (30 x 10PEN) soit au total 600 têtards. Au total cette étude nécessitera au maximum 525 + 525 +450 + 600= 2100 têtards. Le modèle *in vivo* est indispensable dans ce cas précis. Outre l'effort portant sur la Réduction du nombre d'animaux nous travaillons sur l'amélioration (Refinement) des conditions d'élevage par l'introduction de jouets (tuyaux en PVC de taille différente adaptés à celle des animaux) dans les aquariums et l'utilisation de lumière tamisée autant que faire se peut. Par ailleurs, nous portons une attention toute particulière à la diminution du stress imposé aux têtards en réalisant sous anesthésie les observations individuelles du comptage du nombre de cellules vues grâce à la transparence des têtards. Les expériences fonctionnelles ne génèrent à priori aucun stress ni douleur puisque les animaux sont simplement filmés pendant leur activité de nage. Il n'est pas facile de mesurer voire même d'estimer la douleur chez les têtards. Cependant les animaux en expérimentation sont observés bi-quotidiennement ce qui nous permet d'observer éventuellement des difficultés de nage ou de nage anormale, signe clinique qui pourrait suggérer une évolution douloureuse. Dans ce cas nous procédons, sur intervention de l'expérimentateur principal, à un arrêt anticipé de l'expérimentation.

13260 Une très large majorité des cas d'accident vasculaire cérébral droit montrent des troubles de la perception consciente qui conduisent à des symptômes neuropsychologiques handicapants tels que l'héminégligence. Les patients héminégligents semblent vivre dans un monde amputé d'une moitié ; ils ne mangent pas la partie gauche de leur plat, ne voient pas les obstacles situés sur le côté gauche, mais plus important encore, la vie quotidienne d'un patient héminégligent présente plusieurs dangers, qui incluent des risques d'accidents de la route et des chutes graves. Seulement 40% des patients héminégligents récupèrent dans les 6 mois qui suivent leur accident vasculaire. Cela signifie que 480. 000 nouveaux patients européens resteront héminégligents chaque année, ce qui nuit à leur qualité de vie et les empêche de retourner au travail.

Notre équipe a démontré pour la première fois qu'une bonne communication entre le lobe frontal et le lobe pariétal est essentielle à la récupération de l'héminégligence. Cependant, l'héminégligence chez l'animal récupère rapidement et de façon spontanée même dans les cas de déconnexion entre le lobe frontal et pariétal. Les primates utilisent donc un mécanisme de récupération qui n'existe pas chez l'être humain.

C'est pourquoi nous proposons d'étudier la récupération de l'héminégligence chez le primate afin de découvrir de nouvelles pistes de traitement chez l'être humain.

Trois groupes de 5 animaux participeront et une étude pilote de 5 animaux sont programmés pour cette étude. Après des enregistrements d'imagerie sous anesthésie permettant d'identifier certaines spécificités du réseau attentionnel, le singe écureuil sera d'abord entraîné pendant une période de deux mois jusqu'à ce qu'il réalise correctement les tâches classiques de mesure de l'héminégligence (bisection de ligne, barrage de cibles et détection simple de cibles visuelles). En parallèle l'animal passera plusieurs séquences d'imagerie par résonance magnétique (IRM).
Remplacement : Avant d'effectuer mais également dans des projets parallèles à ces mesures *in vivo*, des acquisitions par simulation mathématiques seront effectuées et enrichies par les enregistrements de ce projet. Réduction : Ce projet implique 15 animaux, tous issus d'un élevage autorisé et dédié aux études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

Raffinement : L'état de santé des animaux sera contrôlé de manière régulière avec une attention particulière portée au bien-être animal. Plusieurs procédures seront effectuées afin de réduire au maximum le stress des animaux et ceci par un entraînement quotidien à la coopération (entrée et sortie de cage). Par ailleurs l'utilisation de nouveaux matériels d'implantation limitant le risque d'infection et la biocompatibilité seront choisis. Les méthodes expérimentales proposées ne présentent aucun danger pour l'animal grâce à des critères drastiques d'arrêt en cas de signes de souffrance qui ont été préalablement déterminés. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis.

L'identification des mécanismes de la récupération de l'héminégligence chez l'animal amènera à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques traitables et réduira considérablement le fardeau de la maladie sur les individus, leurs familles et la société en général.

13261 Le tryptophane (Trp) est un acide aminé essentiel nécessaire à la biosynthèse des protéines et c'est également un précurseur biochimique de métabolites qui ont des effets majeurs sur la physiologie des mammifères. Dans le tractus gastro-intestinal, le métabolisme du Trp peut suivre trois voies principales, qui sont toutes sous le contrôle du microbiote intestinal. Les produits finaux de ces voies jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire, des fonctions intestinales et métaboliques et du comportement. Plusieurs maladies qui impliquent le microbiote

Intestinal dans leur pathogenèse sont également impactées par des métabolites du Trp. Cela suggère que l'effet du microbiote dans ces maladies pourrait être, au moins partiellement, médié par un métabolisme du Trp altéré.

Il a récemment été observé qu'une dysfonction du métabolisme du Trp par le microbiote intestinal est impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et des données préliminaires suggèrent un rôle potentiel dans la polyarthrite rhumatoïde. Les objectifs de ce projet sont de comprendre comment certains métabolites du tryptophane pourraient moduler la sévérité d'une arthrite expérimentale chez la souris.

Ce projet a obtenu un financement par un projet européen et s'étalera sur 4 ans. Afin de répondre aux objectifs posés, nous traiterons des animaux arthritiques sauvages avec différents métabolites du Trp. L'arthrite sera induite par une injection intradermique de collagène de type II à la base de la queue des souris (100µl) ou par injection intrapéritonéale d'anticorps anti-collagène de type 2 (100µl). Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de l'invalidation de la sensibilité à ces métabolites, nous utiliserons des animaux KO pour cette voie. L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos groupes de souris seront réduits à 8 animaux. Ce nombre d'animaux (au total 264 animaux) est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données.

L'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant tous les paramètres du tube digestif.

Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuilles de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

13262 Contexte scientifique, médical et social

Vieillir en bonne santé est un enjeu majeur de notre société, qui montre ces dernières décennies une augmentation constante de l'espérance de vie. Connaître les mécanismes régissant la longévité et la régénération des tissus au cours du vieillissement permettrait de proposer des mesures préventives et thérapeutiques pour mieux préserver la santé humaine. L'axe hormonal somatotrope coordonne croissance, métabolisme, et vieillissement. L'inactivation constitutive d'un élément clé de cet axe augmente la durée de vie des souris et renforce la résistance au stress oxydant des cellules, d'où le grand intérêt pour ces hormones dans le contexte de la longévité humaine.

Description des objectifs du projet et des dommages versus les bénéfices apportés

Notre projet actuel vise à caractériser le rôle d'une hormone de croissance dans la physiologie de la souris et notamment de son vieillissement. Nous avons conçu un nouveau modèle transgénique chez la souris pour cela. Nous avons montré que ces mutants sont en bonne santé, fonctions cognitives comprises. Ces mutants présentent certains changements de composition corporelle caractéristiques, sans impact sur l'état de santé général. Leur profil de croissance et leur trajectoire de vie sont modifiés, sans pour autant représenter une diminution de leur état de santé. Dans la présente demande, nous proposons de rechercher les paramètres influençant le vieillissement des deux variantes de nos modèles de souris, en analysant l'équilibre cellulaire et tissulaire *in vivo*, leur métabolisme et leur longévité. Nous évaluerons aussi le statut hormonal au cours du vieillissement et la régénération tissulaire, tout cela pour mieux comprendre les enjeux du vieillissement humain et afin d'améliorer ce dernier. Ce projet inclut donc aussi deux études de longévité. Dans nos projets, chaque souris est utilisée pour obtenir le plus de résultats et de renseignement possible, pour réduire le nombre total de souris demandées. Ces travaux visent à terme une meilleure compréhension des liens entre croissance, métabolisme et longévité au bénéfice du vieillissement et de la longévité humaine. Nous nous assurons que toute intervention, limitée de toute façon à des prélèvements, se fait sous anesthésie.

Conformité de la règle des 3R

Remplacer : Pour étudier les éléments mis en jeu dans le vieillissement, qui est au cœur de ce projet, il est indispensable d'avoir recours à l'animal entier. Il est pour l'instant impossible de recréer la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans un système artificiel, *in vitro*.

Réduire : Ce projet nécessite 488 souris sur 5 ans, le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. À cause des variabilités interindividuelles et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats non valides.

Raffiner : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en minimisant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de maisons de type iglou. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Les définitions et critères pour arrêter les expériences excluent au maximum les douleurs ; le recours à l'anesthésie est systématique. Là où c'est possible, nous préparons des banques

d'organes pour avoir recours aux échantillons en stock pour ainsi éviter systématiquement des expérimentations futures.

13263 La forme génétique la plus courante de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) est liée aux mutations dans le gène C9. Elle consiste en une expansion répétée de l'hexanucléotide GGGGCC (séquence d'ADN anormalement répétée). Les conséquences de cette mutation sont les mécanismes pathologiques observés chez les patients atteints de SLA. Notre objectif est de vérifier si l'élimination de ces répétitions d'ADN, à l'aide d'une approche innovatrice chez la souris modèle SLA, peut entraîner l'arrêt des mécanismes pathologiques et donc permettre un effet thérapeutique. Ce travail donnera les bases du développement préclinique, applicable par la suite à l'homme, d'une thérapie génique pour la forme la plus répandue de la SLA familiale. Ce projet de développement de thérapie génique nécessite obligatoirement l'emploi de mammifères simulant la maladie étudiée avec la mutation concernée afin d'évaluer le plus précisément possible l'efficacité du traitement. Aucune approche *in vitro* n'est possible pour tester notre stratégie.

L'administration d'oligonucléotide antisens (ASO), une séquence génétique synthétique qui peut se lier au matériel génétique muté et "éteindre" les effets des mutations, est une stratégie thérapeutique bien connue pour inhiber l'ADN mutant. Les ASOs, qui se dégradent au cours du temps, doivent être administrés par de multiples injections invasives (injections régulières à prévoir tout au long de la vie du patient à raison d'environ une injection tous les 3-4 mois pour les thérapies actuellement testées). Notre laboratoire a démontré avec succès les avantages d'utiliser un "transporteur biologique" avec ces ASO, dans une autre forme génétique de la SLA, pour contourner ces inconvénients de multi-injections (pour la méthode uniquement basée sur un traitement ASO). Le transporteur biologique permet en effet de limiter le traitement à une injection unique tout en garantissant une efficacité prolongée tout au long de la vie du patient. Pour cette étude nous allons utiliser cette approche avant-gardiste pour "éteindre" les effets de l'expansion répétée de l'hexanucléotide mutant et ainsi diminuer les effets pathologiques chez des souris modélisant la SLA.

L'étude se fera sur une nouvelle souche d'animaux encore peu connue qui nécessitera l'utilisation d'un nombre important d'animaux (la souche murine C9-500 (FVB/NJ-Tg(C9orf72)500Lpwr/J)). La première étape consistera donc à caractériser cette souche et notamment à connaître l'empreinte génomique, c'est-à-dire regarder si l'origine de la transmission de la maladie par le père ou la mère ou les deux parents à une influence sur le degré de gravité de la maladie. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser (application de la règle des 3R) nous ne testerons les effets de notre stratégie thérapeutique que sur la lignée présentant la plus grande atteinte. Pour cette première étape de caractérisation 48 animaux seront utilisés. Nous saurons alors quelle lignée est la plus atteinte.

Après la caractérisation du modèle, nous injecterons ces ASO modifiés (ils se lieront à l'hexanucléotide répété et « éteindront » la mutation), en une seule fois, dans le cerveau de souris malades. Nous comparerons deux différentes constructions (deux modèles de traitement). Toujours dans un souci d'application de la règle des 3R nous commencerons par déterminer l'efficacité des constructions avant d'étudier l'importance de la dose sur la construction ayant permis une efficacité maximale. Nous commencerons donc par injecter des nouveau-nés pour déterminer l'efficacité d'un traitement pré symptomatique (avant l'apparition des symptômes, efficacité optimale). Nous utiliserons pour cette étape 30 animaux. Enfin, une fois la construction optimale connue, nous étudierons avec celle-ci uniquement l'importance de la dose, pour se faire nous utiliserons 120 animaux. Ces animaux dont le développement de la maladie est lent (16 semaines à 1 an) seront surveillés régulièrement. Le suivi du poids, des tests de force et de comportement moteur seront effectués 1 fois/semaine puis 2 fois/semaine après l'apparition des premiers symptômes afin d'observer l'évolution de la maladie.

Ces expérimentations seront réalisées à l'aide des animaux issus de l'élevage initié et entretenu par nos soins. Dans une première phase nous réaliserons 2 trios pour chacune des 3 lignées (empreinte génétique dépendante) soit 18 animaux (dont 12 atteints de SLA). Pour la seconde phase, 4 trios de la lignée sélectionnée seront réalisés, soit 12 animaux supplémentaire (impossible

de connaître la répartition malade/non malade pour ces animaux avant de connaître les résultats de la première phase).

Ces analyses permettront de déterminer l'efficacité de cette approche thérapeutique. En cas de succès, les résultats permettront d'ouvrir une perspective concrète pour le développement d'un candidat thérapeutique applicable à l'Homme.

Au total pour cette étude 228 animaux seront utilisés sans pouvoir les remplacer par une méthode alternative. Le fait d'avancer étape par étape en attendant chaque résultat avant de lancer la phase suivante permet de « Réduire » considérablement le nombre d'animaux utilisés et va dans le sens de l'application de la règle des 3R. Nous porterons également une attention particulière au bien-être des animaux, dans un souci de « Raffinement ». Les animaux seront observés quotidiennement et chaque semaine un contrôle plus poussé, animal par animal sera réalisé jusqu'à l'apparition des symptômes. Une fois l'apparition des symptômes effective nous les contrôlerons 2 fois par semaine voire plus si nécessaire la décision sera prise au cas par cas. Un suivi aussi régulier, de la naissance et tout au long de la vie de l'animal permettra une habituation des animaux à notre présence et une diminution significative de leur stress. Pour l'ensemble de ces expériences nous suivrons les procédures approuvées par le comité d'éthique ainsi que la réglementation en vigueur.

13264 La SLA (Sclérose Latérale Amyotrophique) est une maladie qui se traduit par la perte des motoneurons (cellules de la moelle épinière) et conduit à la paralysie puis au décès des patients dans un délai de 5 ans après le diagnostic. La maladie se présente sous forme sporadique (90% des cas) ou héréditaire (10%). 20% de la forme héréditaire sont dus à une mutation dans un gène à l'origine d'une accumulation de la protéine correspondante dans les cellules, entraînant toxicité et mort cellulaire. C'est sur cette forme de la pathologie que notre projet est focalisé. A l'heure actuelle il existe deux traitements, le Riluzole et l'Endarvone, ayant des effets très faibles chez les patients. Nous avons démontré le fort potentiel d'un traitement de thérapie génique en utilisant des virus modifiés (vecteurs) capable de cibler les cellules malades (incluant les neurones, cellules de la moelle épinière très atteinte dans la maladie). Les vecteurs ont été construits pour cibler le gène muté avec l'objectif de réduire l'accumulation toxique de la protéine et retarder l'apparition des symptômes chez le modèle animal de la maladie.

Notre projet a pour but de déterminer la dose thérapeutique idéale afin de démarrer une étude préclinique de thérapie génique et pouvoir amener ce projet en phase clinique puis permettre un traitement chez l'Homme.

L'étude se fera sur des souris transgéniques reproduisant la maladie et ses symptômes, la souche SOD1G93A. Ces animaux déclarent les premiers symptômes à 90 jours, puis leur état général se dégrade jusqu'à la mort à 130 jours. Afin de réduire le facteur environnemental, les animaux utilisés pour ce projet seront hébergés dans une pièce indépendante à accès restreint, limitant ainsi les passages. Une attention particulière sera également portée au choix du matériel utilisé. L'acquisition d'un portoir ventilé permettra d'optimiser le change des animaux et de réduire leur stress en effectuant un minimum d'interventions, augmentant ainsi leur bien-être. Le matériel d'expérimentation utilisé sera stocké dans une pièce à accès restreint, limité au personnel dédié à ce projet. Nous testerons les effets moléculaires de quatre vecteurs viraux différents : deux à visés thérapeutique et leur contrôle respectif. Nous allons tester ces quatre constructions sur des groupes de 8 animaux (répartition homogène mâles/femelles) en incluant un groupe contrôle non injecté (NI). 8 correspondent à un nombre restreint d'animaux pour cette lignée. Nous sacrifierons les souris 1 mois après leur injection et nous analyserons alors l'efficacité de nos traitements.

Nous comparerons également l'effet sur la survie des deux vecteurs thérapeutiques (pour réduire le nombre d'animaux nous n'utiliserons pas d'animaux contrôles), sur des animaux injectés à l'âge adulte à P50. Pour cela, 2 groupes de 5 animaux chacun seront injectés avec l'un ou l'autre des vecteurs. L'étude de la survie nous donnera une information complémentaire pour déterminer le vecteur optimal.

Une fois le vecteur sélectionné, une étude plus complète sera réalisée pour déterminer la dose thérapeutique. 3 différentes doses de ce vecteur seront comparées à un groupe d'animaux non

injectés. Nous pourrions alors envisager un passage de la thérapie génique aux patients atteints de SLA liée aux mutations SOD1. Un total de 144 animaux sera nécessaire pour les expériences de survie et les analyses biochimiques.

L'utilisation de cette souche transgénique est indispensable pour faire avancer la recherche. Le travail *in vitro* ne permettant pas encore d'obtenir les informations escomptées pour étudier les effets des traitements. Cette souche est la plus utilisée dans les études précliniques de thérapies pour la SLA et différentes études décrivent la meilleure façon de l'utiliser au laboratoire pour avoir des résultats statistiquement significatifs.

Le suivi des animaux au cours du projet sera adapté en fonction de l'évolution de la maladie. Un suivi journalier sera effectué pour vérifier l'état général des souris ainsi qu'une étude complète hebdomadaire (poids, tests comportementaux, tests de force). Les souris seront suivies par un technicien dédié au projet, sous la supervision d'un ingénieur d'étude expert en bio-expérimentation animale. L'utilisation d'un appareil automatisé nous aidera à relever des modifications subtiles dans le comportement des animaux. Dès l'apparition des premiers symptômes nous veillerons au bien-être des souris en suivant attentivement l'évolution des paramètres jusqu'aux points limites. Les points limites seront déterminées selon les règles écrites dans le document « working with ALS mice » ainsi qu'en respectant la réglementation en vigueur.

Au total 209 animaux seront nécessaires (15 pour la reproduction, 50 pour sélectionner le vecteur optimal, 144 pour déterminer la dose thérapeutique).

A l'heure actuelle aucune méthode de substitution n'existe pour pouvoir remplacer l'utilisation des animaux. Afin de limiter leur utilisation un nombre limité d'animaux sera utilisé en contrôle non injecté et les mâles reproducteurs permettront d'étudier une éventuelle dérive de la lignée.

13265 L'imagerie TEP (tomographie par émission de positons) est une technique non invasive permettant la visualisation de cibles dans un organisme en temps réel. Son principe consiste en l'injection d'une molécule couplée à un élément radioactif. La molécule va se fixer sur sa cible et grâce à la désintégration de l'élément radioactif son emplacement pourra être estimé pour obtenir une image de la distribution de la molécule. Pour cette étude nous travaillons sur une molécule : VH04127-NH2, identifiée comme prometteuse pour le diagnostic de différents cancers. L'objectif est de radio-marquer le VH04127-NH2 avec du gallium-68 (élément radioactif), afin de réaliser une étude du devenir de la molécule dans un organisme (pharmacocinétique). Pour cette évaluation un modèle de glioblastome sera étudié et une fois le 68Ga-DOTA-VH04127-NH2 administré la concentration de distribution de l'agent diagnostique sera quantifiée à 5, 20, 45 et 90 minutes. Cette étude permettra de valider l'intérêt de la molécule et de prouver son efficacité diagnostic.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir 15 animaux. La règle des 3R a été envisagée lors de l'élaboration du projet. Tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Le modèle *in vivo* chez la souris est indispensable car il permet d'avoir des résultats de pharmacocinétique dans tous les organes y compris la tumeur dans le but d'un transfert de la sonde chez l'homme.

13266 Alors que les LED (Light emitting diodes) envahissent le marché, il a récemment été mis en évidence que des risques liés à l'utilisation de certaines de ces lampes existent, en particulier pour la rétine. En effet, les LEDs peuvent contenir une part importante de lumière bleue qui est toxique pour les cellules rétinienne. Ainsi, il a été montré que les lampes à LEDs sont beaucoup plus toxiques pour la rétine que les lampes fluorescentes. L'objectif de ce projet est donc de comparer les mécanismes lésionnels activés par la lumière. Pour cela, le modèle animal est indispensable, nous exposerons des animaux à la lumière fluorescente ou LEDs pendant quelques heures et nous étudierons sur le plan moléculaire et électrophysiologique les modifications induites par l'exposition. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre d'animaux sera limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs : 1 œil sera utilisé pour une analyse et

l'autre pour une autre analyse de manière à obtenir le maximum de données sur un même animal et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'élevage où l'environnement est contrôlé. Les protocoles expérimentaux sont établis avec rigueur et les animaux sont surveillés sur toute la durée des protocoles au quotidien. Afin de mener à bien ce projet, nous utiliserons au maximum 576 rats sur une période de 5 ans.

13267 Les dégénérescences rétinienne affectent un nombre croissant de personnes dans une population mondiale vivant de plus en plus âgée. Trouver des traitements efficaces pour contrer l'évolution de la maladie menant à la cécité est un enjeu crucial de santé publique.

Avec l'allongement de l'espérance de vie, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de cécité dans les pays développés. Dans cette maladie, au niveau de la rétine, un dysfonctionnement de l'épithélium pigmenté (RPE) entraîne la dégénérescence des photorécepteurs, les cellules sous-jacentes qui captent la lumière et forment le message visuel. La préservation de ces photorécepteurs représente donc un enjeu de santé majeur.

Dans la rétine, trois types cellulaires expriment le facteur de transcription Otx2 : le RPE, les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Au laboratoire, nous disposons d'un modèle de souris mutante où l'expression d'Otx2 est supprimée dans toutes les cellules de la rétine, provoquant la dégénérescence sélective des photorécepteurs et mimant ainsi la DMLA. Nos données préliminaires suggèrent que cette perte d'expression d'Otx2 affecte en priorité le RPE, mais une fonction d'Otx2 au sein même des photorécepteurs ou dans les cellules bipolaires ne peut pas être écartée. Dans ce projet, nous supprimerons le transfert d'Otx2 entre plusieurs types cellulaires de la rétine, et analyserons l'effet de cette perte du transfert sur la survie à long terme des photorécepteurs. Ce projet permettra de tester l'hypothèse selon laquelle Otx2 pourrait être transférée entre cellules voisines et exercer un effet neuro-protecteur par ce biais.

Nous induirons l'expression d'anticorps anti-Otx2 qui supprimeront toute protéine Otx2 extracellulaire et nous analyserons la survie des photorécepteurs dans ces conditions. Enfin, si ce transfert est avéré, nous étudierons le mécanisme de sécrétion, et nous testerons les effets protecteurs de la protéine Otx2 extracellulaire dans un modèle de dégénérescence rétinienne déjà établi.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité rétinienne ne peut être mesurée par des tests *in vitro*.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

Remplacer : En parallèle des expérimentations sur l'animal, des études préalables *in vitro* ont déjà été effectuées pour tester les propriétés de la protéine Otx2.

Raffiner : Nos conditions d'élevage incluent stabulation par 4-5 animaux, enrichissement du milieu, température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. La majorité des procédures pourront générer un inconfort faible et de courte durée, mais non dommageable pour l'animal. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi rapproché permettra de détecter une souffrance potentielle et de décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés. ^[1]_{ISÉP}

Réduire : Nous limiterons la taille des échantillons à ce qui est strictement nécessaire pour garantir une puissance statistique acceptable. Pour limiter le nombre d'animaux produits nous utiliserons

indifféremment des animaux des deux sexes. Enfin, certaines procédures ne seront réalisées que dans le cas où les procédures et expériences précédentes auront donné des résultats les justifiant. Le nombre total de souris pour ce projet est 296.

13268 *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie de l'environnement induisant de graves infections respiratoires chez les sujets fragilisés comme ceux se trouvant en réanimation, ceux atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive ou encore ceux atteints de mucoviscidose. Parmi les dernières molécules restant actives sur les bactéries résistantes aux antibiotiques figurent les carbapénèmes. Malheureusement 20 à 30% des souches de *P. aeruginosa* sont résistantes aux carbapénèmes. Ceci est dû à une modification du canal d'entrée (OprD) de ces antibiotiques dans la bactérie.

Avec des collègues d'une autre équipe, nous avons montré qu'une souche de *P. aeruginosa* devenue résistante aux carbapénèmes par ce mécanisme présentait une augmentation de sa survie et de sa virulence dans l'intestin de souris. Par la suite, au sein de notre équipe, nous nous sommes interrogés sur l'action de cette bactérie vis-à-vis de l'épithélium respiratoire. En effet, l'atteinte de la barrière épithéliale des voies respiratoires est la première étape de l'infection pulmonaire. La plus grande pathogénicité de cette bactérie résistante aux antibiotiques pourrait donc être expliquée par son action sur l'épithélium. Grâce à un modèle *in vitro* d'épithélium respiratoire humain, nous avons pu montrer que la bactérie résistante aux antibiotiques détruisait plus vite l'épithélium que la bactérie sensible. De plus, ce modèle *in vitro*, nous a permis d'identifier trois gènes candidats de *P. aeruginosa* à l'origine de l'augmentation de virulence de cette souche bactérienne. Ils sont tous impliqués dans la réponse de *P. aeruginosa* au stress oxydatif généré par l'épithélium respiratoire.

Notre modèle *in vitro* d'épithélium respiratoire humain a pour limite de ne pas prendre en compte la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de *P. aeruginosa* puisque seule la réponse innée n'est assurée (prise en compte de la règle des 3R, remplacement). Le recours au modèle murin de pneumonie aiguë est donc nécessaire afin de prendre en compte la réponse globale de l'hôte, au niveau pulmonaire.

Le projet scientifique est de déterminer chez l'animal les mécanismes impliquant ces trois gènes candidats dans l'infection pulmonaire aiguë afin de proposer des cibles thérapeutiques alternatives pour traiter cette souche résistante aux antibiotiques.

La notion de réduction (3R) a été prise en compte, puisque les groupes expérimentaux seront limités à 10 animaux permettant l'analyse statistique et la collecte du maximum de données par animal. De plus, il se déroulera sur 5 ans afin de pouvoir réaliser les groupes expérimentaux infectés (souris C57/BL6 femelles) par étape et de tenir compte des résultats obtenus pour évaluer à chaque fois la pertinence des groupes expérimentaux suivants. Au total, 270 animaux sont prévus pour 27 groupes expérimentaux. Le raffinement (3R) de la procédure expérimentale a impliqué l'établissement de points limites ont été établis, d'une anesthésie pour éviter le stress occasionné par l'infection et une analgésie pour lutter contre la douleur et la dyspnée des animaux.

13269 Dans le cadre de traitements anti-tumoraux, le développement de méthodes permettant de manipuler le système immunitaire à des fins thérapeutiques, a fait l'objet de nombreux efforts de recherche depuis ces dernières décennies. En particulier, la mise au point de protocoles s'appuyant sur l'utilisation d'inhibiteurs a ouvert de nouvelles perspectives en immunothérapie. En effet, ces méthodes permettent de contourner une partie des mécanismes développés par les cellules tumorales pour inhiber les réponses immunitaires. Cependant, l'application de ces protocoles reste limitée, car ils ne sont efficaces que chez une minorité de patients, et pour certains types de cancers. Par conséquent, des efforts considérables restent à faire pour augmenter l'applicabilité de ces protocoles immunothérapeutiques, et pour améliorer leur efficacité. Pour atteindre cet objectif, il est important de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition du système immunitaire dans le microenvironnement de la tumeur.

Au cours d'une réponse immunitaire, des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques et les macrophages, internalisent et présentent des antigènes aux lymphocytes T,

déclenchant une réponse immunitaire. Selon le type de ligand et de récepteur spécifique activé dans ces cellules, la réponse immunitaire sera immunogène ou tolérogène.

Notre protéine d'intérêt qui est liée à une variété de processus physiologiques et pathologiques tels que la progression du cancer, voit son expression augmentée dans de nombreux types de cancer et est corrélée avec un mauvais pronostic. Cependant, son rôle biochimique et physiologique dans ce contexte n'est pas entièrement connu ainsi que sa relation avec le système immunitaire.

Le but de ce projet est de mieux comprendre le rôle notre protéine d'intérêt dans les mécanismes de détournement du système immunitaire par la tumeur dans des souris déficientes ou non pour notre protéine.

Dans le cadre de ce projet, prévu pour durer 5 ans, nous prévoyons d'utiliser au maximum 3800 souris. Ce nombre s'explique par la nature des expériences que nous devrons réaliser et sera justifié en détail dans les procédures expérimentales expliquées dans cette demande d'autorisation de projet.

Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet. Afin de minimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet, nous nous attacherons à constituer des groupes expérimentaux aussi réduits que possible permettant toutefois d'obtenir des résultats interprétables statistiquement. Nous nous attacherons aussi à analyser de chaque expérience impliquant des animaux autant de paramètres que possible, permettant ainsi d'établir des corrélations potentiellement importantes. Enfin, pour chaque expérience, une feuille de score détaillée est suivie par les expérimentateurs, leur permettant d'évaluer avec précision le point limite de l'expérience. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront interrompues avant la souffrance des animaux.

13270 La maladie de Parkinson (MP) est due à la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN), qui résulte d'une cascade multifactorielle d'événements pathogéniques encore partiellement élucidés.

Ce projet s'attaquera à deux problèmes non résolus concernant la maladie de Parkinson en se concentrant sur la protéine Glypican4, régulateur de morphogène. Notre premier objectif est de fournir une source pertinente de neurones dopaminergiques (DA) pour la thérapie de remplacement cellulaire spécifique du patient à partir de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC). Nous avons démontré que la régulation négative de Glypican4 dans les cellules souches (CS) embryonnaires de souris (MESC) confère un état biologique unique que nous nommons "safe-PSC state", qui permet une différenciation améliorée des neurones DA, une récupération motrice et une réduction de la tumorigenèse des CSEm greffés à un stade indifférencié, dans les modèles de rat de MP. Par conséquent, une régulation à la baisse de Glypican4 devrait permettre d'être une source cellulaire idéale pour le traitement de la MP, avec des caractéristiques sans précédent de sécurité, efficacité et rentabilité. Dans une perspective translationnelle, nous étudierons les propriétés thérapeutiques de la protéine Glypican4-mutant hiPSCs hiPSC transplantée dans les modèles chez le rat en tant que cellules indifférenciées. Nous examinerons la génération / différenciation des neurones DA dans la récupération motrice, l'intégration anatomo-fonctionnelle et la tumorigenèse. Dans la perspective de greffes de cellules autologues, la robustesse de l'état « Safe-PSC » à travers Glypican4 et sa régulation à la baisse sera évaluée dans les hiPSC de patients atteints de MP cultivés dans des conditions normales et dans des conditions incluant un mécanisme oxydatif. Le second objectif est de comprendre Glypican4 en tant que potentiel marqueur biofluidique dans la MP en mesurant ses taux circulants (LCR, sérum sanguin) chez des patients.

Les conséquences pour le bien-être animale sont minimales dans notre projet puisque classiquement seul une légère perte de poids peut être observée. Cependant, avec le nouveau protocole développé ici, cette perte de poids devrait être évitée. Toutefois, nos animaliers sont formés à détecter tout signe d'inconfort des animaux comme un changement d'appétit, une perte (plus de 20% du poids comparé au poids avant le début de l'étude), des changements du niveau d'activité. Nous avons mis en place une grille de suivi des paramètres observés sur le comportement général

de l'animal. Il faut considérer que les animaux seront habitués à être manipulés par l'expérimentateur et observés quotidiennement. Dans ce contexte, l'évaluation des rongeurs pour guetter l'apparition éventuelle de signes, sera notifiée dans la grille de score (en Annexe). Lors des différentes procédures, des mesures sont mises en place pour réduire la douleur : Anesthésie avec Kétamine/Xylazine (respectivement, 100 et 10 mg/kg, 1 ml/kg) pour la chirurgie, Anesthésie locale par application de gel de Lidocaïne, Antalgie au Paracétamol (500mg/l) dans l'eau de boisson pendant 3j post-opératoire, Nourriture hydratée disposée dans la cage.

Pour cette étude programmée sur trois années, nous utiliserons 60 rats qui seront maintenus dans des conditions optimales d'une animalerie à statut EOPS, avec des pièces cyclées en 12h jour/nuit, température et hygrométrie régulées, et un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Pour s'inscrire dans le respect de la règle des 3R, l'impératif d'utiliser le rat comme modèle animal nous astreint à évaluer le nombre d'animaux au plus juste, afin d'être optimisé pour avoir des résultats statistiquement pertinents, et de proposer la stabulation en groupe avec différents types d'enrichissement disposés dans leur cage, en alternance (coton, nourriture, papier à déchirer, balles, bâtonnets de bois... disposés dans leurs cages), à chaque changement de litière (2 fois/sem). Toutes ces mesures prises permettent de maintenir les animaux dans des conditions sereines d'activités et de relations sociales optimales.

13271 Le système immunitaire constitue le système de défense du corps humain contre les infections virales et bactériennes. Des médicaments ont été mis au point pour renforcer préventivement ces défenses. Ils sont utilisés en général à l'approche de l'hiver en prévention des épidémies de grippe et autres maladies infectieuses des voies respiratoires. Ces médicaments font partie de l'arsenal thérapeutique utilisés seuls ou en parallèle de la vaccination contre la grippe qui entraîne chaque année une surmortalité chez les personnes à risque, âgées ou immuno-déficientes. Ces médicaments sont constitués de fragments de parois bactériennes. Ingérés par voie orale, ils stimulent les défenses immunitaires du système digestif en augmentant la production d'anticorps lors d'une exposition à un agent bactérien ou viral.

Ce mécanisme propre aux composants de parois bactériennes ne peut pas être reproduit *in vitro* car il nécessite les composants cellulaires du système immunitaire présents au niveau du système digestif ainsi que les composants cellulaires du système immunitaire présents dans le sang et certains organes comme la rate. Ainsi, ce type d'effet immunostimulant est étudié chez la souris pour reproduire les interactions complexes entre les différents organes du système immunitaire et mimer les processus immunitaires humains.

Le modèle des PFC consiste à exposer le système immunitaire à un antigène étranger que l'animal n'a jamais rencontré comme il le serait vis-à-vis d'une bactérie ou d'un virus. L'antigène choisi est le globule rouge de mouton injecté par voie intraveineuse. En réponse à cette exposition, le système immunitaire reconnaît cet antigène comme un élément étranger puis produit des anticorps visant à le neutraliser. La production d'anticorps s'effectue notamment au niveau des cellules de la rate. Celle-ci est prélevée puis broyée pour isoler les cellules de la rate produisant les anticorps anti globules rouges de mouton. Une fois isolées, ces cellules sont placées sur un tapis de globules rouges de mouton. Les cellules de la rate produisant des anticorps anti globules rouges de mouton font éclater les globules rouges créant ainsi des trous (ou plages d'hémolyses ou PFC pour plaque forming cells en anglais) dans le tapis de globules rouges. Cette technique permet ainsi de dénombrer le nombre de cellules de la rate produisant des anticorps anti globules rouges de mouton. Les médicaments testés dans ce modèle augmentent le nombre de cellules de la rate produisant des anticorps. Cette technique permet ainsi de mesurer leur effet immunostimulant.

Dans le cas de médicaments à base de mélange de parois bactériennes et en raison de la complexité de ces mélanges, il est réglementairement requis de vérifier l'activité immunostimulante de chaque lot de production par ce modèle. Cette exigence a pour objectif de garantir l'efficacité de ces traitements préventifs au bénéfice des sujets à risque de maladies infectieuses respiratoires.

Ce modèle murin est reconnu par la communauté scientifique comme un des modèles les plus prédictifs pour évaluer un effet immunostimulant mais aussi immunodépresseur ou immunomodulateur. Il peut être appliqué également au rat.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (nids, jouets, objets à ronger, incitation au fouissement).
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives reconnues réglementairement pour remplacer ce modèle.

La sévérité du modèle est qualifiée de légère car l'acte susceptible de générer le niveau de douleur le plus élevé est constitué par l'injection intraveineuse notamment de globules rouges de moutons.

Pour tester un lot de médicament immunostimulant, il est réglementairement requis de réaliser le test des PFC sur 3 séries indépendantes incluant 20 animaux par série, soit 60 animaux au total par lot. Compte tenu du nombre de lots à tester par an, le projet prévoit que 8 000 souris et 100 rats au maximum soient utilisés sur la durée de 5 ans du présent projet.

13272 Parmi les filières de production animale, la filière porcine est soumise à une concurrence particulièrement forte au sein de l'Union Européenne, de même qu'avec les autres bassins de production mondiaux. Dans ce contexte, la maîtrise des coûts constitue un enjeu majeur et constant pour la filière. L'aliment représentant jusqu'à 69% des coûts de production, l'amélioration de l'efficacité alimentaire constitue donc un des leviers d'action important pour améliorer la compétitivité des élevages porcins. Outre ces aspects de compétitivité, la filière porcine est également interrogée par la société sur ses impacts environnementaux, l'usage des médicaments et le bien-être animal. Son acceptabilité et sa durabilité passent donc par des améliorations sur ces différents plans. L'élevage de précision semble être une voie prometteuse pour répondre à ces enjeux. Ce concept peut être défini comme le pilotage de l'élevage grâce au suivi automatisé et en temps réel de la production, de la reproduction, de la santé et du bien-être des animaux. L'objectif est d'améliorer les performances économiques, sociales et environnementales de l'élevage par une meilleure gestion du troupeau en prenant notamment en compte les besoins individuels des animaux. Dans ce contexte d'élevage de précision, l'alimentation de précision est une technique en développement qui permet l'ajustement dynamique le plus fin possible des apports nutritionnels (en quantité et en qualité) aux besoins des animaux, afin d'améliorer l'efficacité alimentaire tout en diminuant le coût et les rejets notamment d'azote et de phosphore. L'application de ce concept nécessite de mesurer la réponse des animaux à l'alimentation (poids, épaisseur de lard dorsal, ingestion), puis de traiter ces données pour définir les besoins des animaux et la composition de l'aliment à distribuer pour répondre à leurs besoins sans excès ou manque. Enfin, des dispositifs techniques permettant de distribuer en temps réel ces aliments sont nécessaires.

Deux outils d'aide à la décision ont été développés pour traiter les données individuelles des truies en gestation et en lactation, déterminer en fonction des performances de chaque truie la composition de l'aliment à lui distribuer chaque jour et piloter un distributeur d'aliment capable de distribuer un aliment spécifique pour chaque animal. L'objectif de ce projet est de tester l'application des outils d'aide à la décision en conditions pratiques sur 126 truies (7 bandes de 18 truies). Les calculs utilisés dans l'outil doivent en effet être testés en condition réelle pour être ensuite affinés et permettre un ajustement le plus fin possible des apports alimentaires aux besoins des animaux. L'hypothèse est que l'alimentation de précision va permettre de réduire les rejets en phosphore et nitrogen, le coût alimentaire et les nutriments utilisés tout en maintenant les performances des animaux. Pour chaque bande de 18 truies, l'application de l'alimentation de précision (mélange journalier et individuel de 2 aliments), distribuée à la moitié des truies de la bande, sera comparée à celle de l'alimentation conventionnelle (1 aliment pour toutes les truies pendant la gestation et 1 aliment pour toutes les truies pendant la lactation).

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur les animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de mesurer les réponses des truies à leur alimentation. Ces travaux ne peuvent se faire autrement que sur un animal entier et vivant. Les données générées dans ce travail seront ensuite utilisées pour améliorer l'outil actuel. Raffinement : cette expérimentation est réalisée dans une salle avec des équipements (station d'alimentation automatique, capteurs d'activité et de température) permettant de mesurer les performances individuelles d'animaux élevés en conditions proches de celles rencontrées pratiquement en élevage (logement en groupe pour les truies gestantes, logement individuel pour les truies en lactation). Réduction : le nombre d'animaux (126 truies) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs et permet d'atteindre le niveau de précision souhaité pour évaluer avec précision les effets de l'alimentation malgré la forte variabilité interindividuelle généralement observée dans ce type d'étude.

13273 Les traitements contre les infections bactériennes constituent un champ de recherche prépondérant dans le paysage scientifique moderne : les résistances bactériennes aux antibiotiques actuellement utilisés obligent en effet les chercheurs à trouver rapidement des alternatives efficaces. La vaccination mucosale constitue une approche innovante et d'intérêt pour protéger l'organisme contre les infections. Dans ce contexte, il est important d'évaluer le potentiel vaccinal de vecteurs bio-sourcés permettant d'améliorer la délivrance d'antigène vers les cellules immunitaires, en s'affranchissant des voies d'administration parentérales, en réduisant les doses vaccinales, et en limitant l'utilisation d'adjuvants. Le projet vise ainsi à comparer l'efficacité vaccinale de différents vecteurs d'antigènes, par différentes voies d'administration, et nécessitera l'utilisation de 360 souris de souche C57BL/6J dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement : Des tests *in vitro* sur des lignées cellulaires épithéliales et immunitaires ont déjà permis de sélectionner les meilleurs vecteurs.

Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature. De plus, un maximum d'analyse sera effectué sur chaque souris afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux.

Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi. Tout animal présentant un signe quelconque de mal-être sera traité en conséquence, et éventuellement écarté de l'étude.

13274 Le cancer pancréatique est un des cancers les plus agressifs. Le taux de survie globale à 5 ans est inférieur à 5%, et la médiane de survie globale est de 6 mois. Ce mauvais pronostic s'explique en partie par notre incapacité à diagnostiquer ce cancer à un stade suffisamment précoce mais également au faible têt de réponse des traitements en vigueur. En effet, les traitements les plus efficaces, qui ne sont disponibles que pour une fraction des patients dû à leurs forts effets secondaires, montrent soit des patients complètement résistants soit des patients qui vont développer des phénomènes d'échappement thérapeutique (taux de survie à 5 ans de 20%). L'ensemble des thérapies actuelles se focalisant sur les cellules tumorales, un large champ de recherche s'est alors intéressé au contexte cellulaire tout particulier de ces tumeurs, son implication dans la résistance aux traitements et son ciblage potentiel en thérapie combinée avec les drogues déjà existantes.

En effet, si la grande majorité des études s'est penchée sur le comportement des cellules tumorales ce n'est que très récemment qu'un potentiel rôle du microenvironnement a été suggéré. Le microenvironnement ou stroma est constitué de plusieurs types cellulaires non tumoraux tels que les cellules immunitaires ou les fibroblastes. Or, il se trouve que dans la plupart des tumeurs solides (prostate, sein) il est dorénavant admis que ce microenvironnement participe au développement de la tumorigénèse. Dans le cas des tumeurs pancréatiques ce microenvironnement constitue près de 80% de la masse tumorale. Notre équipe a par ailleurs démontré le rôle prépondérant du dialogue inter-cellulaire, à travers des vésicules extra-cellulaires, entre le stroma et les cellules tumorales

dans l'agressivité des tumeurs pancréatiques. Néanmoins, le mécanisme d'action, le mode d'internalisation et les modulations induites dans les cellules cancéreuses restaient inconnues.

Nos résultats préliminaires suggèrent que le dialogue stroma-cellules tumorales médié par les vésicules extra-cellulaires produites par les Fibroblastes Associés au Cancer (CAFs) nécessite la présence de la molécule CD9 dans la membrane des VEs. D'après nos résultats, CD9 est nécessaire à l'internalisation des VEs par les cellules tumorales afin d'y induire des voies de signalisation permettant d'augmenter leur capacité de migration et de dissémination. Afin de valider ces résultats nous désirons passer à une étude *in vivo*.

Pour ce faire, nous allons combiner dans cette étude l'utilisation de 81 souris réparties dans 3 procédures différentes permettant d'analyser, sur modèles de cancer pancréatiques xéno-gréffés ou endogènes, l'impact du ciblage thérapeutique de CD9 dans le développement et la progression des cancers pancréatiques. Un anticorps bloquant de CD9, déjà validé, sera pour cela utilisé. En suivant le développement tumoral et la survie des animaux grâce à ces 3 protocoles, nous pourrons valider l'effet du ciblage thérapeutique de CD9.

La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation d'un total de 81 animaux sans méthode alternative possible. Les concepteurs et expérimentateurs s'engagent à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant la réalisation de statistiques et l'extraction de résultats fiables et robustes qui serviront les avancées scientifiques de demain. Afin de respecter la règle des 3 R, nous avons, pour l'ensemble de ces procédures, mis en place un suivi journalier des animaux, une prise en charge spécifique de la douleur lors des chirurgies et en suivi post-chirurgical mais également lors du suivi quotidien des souris si nécessaires. De plus, un enrichissement renouvelé toutes les semaines incluant 3 enrichissements différents sur des cycles de trois semaines est en place dans l'animalerie et le nombre d'animaux a été calculé par des tests statistiques permettant de réduire à minima le nombre d'animaux utilisé par ces procédures.

13275 L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une maladie multifactorielle souvent associée à l'hypertension artérielle et au diabète. Si elle n'est pas correctement traitée, l'IRC conduit à la mise en place d'une hémodialyse. L'obstruction urétérale unilatérale (OUU) est un modèle expérimental couramment utilisé pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les lésions rénales responsables de la progression vers l'insuffisance rénale chronique. Ce modèle permet également des études pharmacologiques précliniques visant à tester de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir, freiner, voire stopper, l'insuffisance rénale chronique. En accord avec la littérature nous utiliserons des modèles murins appropriés soit 320 souris C57Bl6/J et 160 rats Sprague Dawley, sur la durée du projet. Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet. Les expériences sont organisées de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux. Suite à la chirurgie, une injection de buprénorphine est pratiquée pour limiter la douleur au réveil. Compte tenu des potentiels effets indésirables de certaines procédures sur l'état de santé global des animaux, les expériences font l'objet d'un suivi attentif et précis de leur bien-être et de la douleur selon les exigences de la règle des 3R. Des points limites sont définis au-delà desquels les animaux seraient euthanasiés.

13276 Entre les repas ou lors d'un jeûne, l'organisme est capable de maintenir le taux de glucose (sucre) dans le sang (glycémie) à environ 1g/L, grâce à une production par le foie, les reins et l'intestin. Cette fonction est affectée dans le cadre du diabète de type 2, qui est caractérisé par une production de glucose trop importante, entraînant des hyperglycémies. En plus des dérégulations de la glycémie, le diabète est caractérisé par le développement de complications hépatiques importantes telles que l'accumulation de graisses pouvant mener au développement de cancers hépatiques qui sont une cause majeure de morbidité. La compréhension des mécanismes sous-jacents est nécessaire pour la mise en place de traitements adaptés.

Dans cette étude, nous étudierons le développement de la fibrose et des tumeurs hépatiques chez des souris transgéniques dont la production de glucose est activée ou inhibée dans l'intestin. Le processus sera accéléré par un régime spécifique (déficient en méthionine et en choline).

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R :

Remplacement :

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux puisque la fonction étudiée, la production de glucose par l'intestin, a des impacts sur l'ensemble du métabolisme de l'organisme et implique des dialogues entre organes. En effet, le glucose produit par l'intestin est détecté au niveau des senseurs de glucose dans les vaisseaux qui vont transmettre un signal nerveux au niveau du cerveau. En réponse, le cerveau va émettre des signaux nerveux en périphérie, régulant en particulier le métabolisme du foie.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et du métabolisme glucidique, mais aussi des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 12 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 120 souris mâles transgéniques et contrôles.

Raffinement :

Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Les procédures sont maîtrisées par les personnes en charge de l'expérimentation animale. Les souris seront nourries avec un régime connu pour favoriser le développement d'une fibrose spécifiquement dans le foie chez la souris. Pour limiter l'effet délétère de ce régime, nous avons choisi un régime enrichi en graisse et comportant 0,1% de méthionine ce qui permet de limiter la perte de poids. Nous suivrons le développement potentiel des tumeurs par IRM et par palpation abdominale. De plus, des tests biologiques permettant de suivre les dommages hépatiques seront réalisés, et le comportement des animaux sera surveillé. L'ensemble de ces paramètres nous permettra de mettre fin au protocole si les tumeurs sont trop nombreuses ou trop grosses ou si l'atteinte hépatique est importante.

Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

Ce projet devrait permettre de déterminer les conséquences d'une dérégulation de la production intestinale de glucose sur le développement de la fibrose et des tumeurs dans le foie.

13277 Effet d'un régime riche en glucides et en lipides sur la lipogenèse et mécanismes de régulation cellulaire.

Ce protocole est utilisé dans le cadre d'activité d'enseignement au cours de travaux pratiques. Ces travaux pratiques ont pour objectif de répondre à une question scientifique physiologique nécessitant l'utilisation d'animaux et permettant d'initier les étudiants à des techniques de prélèvement d'organe, de biologie moléculaire utilisées en recherche et des techniques de biochimie via le dosage de certains paramètres métaboliques (dosage de la glycémie et des triglycérides plasmatiques). Les animaux sont mutualisés pour les différents cursus universitaire proposant ces travaux pratiques (master 1 et 2 en nutrition et sciences des aliments et 3ème année du cursus ingénieur agronome). Le but de cette expérimentation est d'évaluer l'activation de la lipogenèse (formation des acides gras dans l'organisme) sur des animaux (souris C3H ou rat Wistar Han) ayant été nourris avec un régime riche en glucides et en lipides ou d'évaluer l'effet des boissons sucrées sur la prise de poids. Pour cela, les animaux seront nourris avec un régime équilibré et l'eau de boisson sera remplacée par de l'eau sucrée. Des cultures d'hépatocytes et d'adipocytes permettront de comparer *in vitro* les résultats avec ceux obtenus *in vivo*. Cette activation de la lipogenèse est caractérisée par l'adiposité (accumulation de tissu adipeux) mais également par l'expression d'un gène, la « fatty acid synthase » (fas). Les travaux pratiques se déroulent au cours de l'année dans 3 modules avec deux séances pour les Master 1 et une pour les Master 2 (Nutrition et Sciences des aliments) et une séance pour les élèves ingénieurs de 3ème année, qui eux utilisent les organes prélevés par les groupes précédents. Les résultats obtenus par les deux groupes d'étudiants de M1 serviront à un quatrième module, le module de statistique, dans

lequel seront étudiées les méthodes d'analyse statistique des effets biologiques. Le nombre d'animaux utilisé durant une séance de travaux pratiques est de 7 (7 animaux/séance x 3 séances) soit 21 animaux sur une année. Pour sensibiliser les étudiants à la culture cellulaire et donc à utiliser moins d'animaux, pour chaque séance de travaux pratiques (3 par an) nous utiliserons 2 rats pour la culture d'hépatocytes et d'adipocytes (soit 6 rats par an). Le nombre total d'animaux pour les 5ans sera donc de 135 animaux. Les animaux seront soit des rats ou des souris sortis d'un protocole où l'euthanasie n'est pas obligatoire, soit des rats ou des souris qui arriveront 3 semaines avant les dates de travaux pratiques. Après une semaine d'habituation, les animaux seront répartis en 3 groupes (7 animaux/groupe) en cages collectives (3 cages de 3 souris/rats et 3 cages de 4 souris/rats). Pendant 2 semaines, les animaux sont nourris avec un régime équilibré en macronutriments pour 2 groupes et le troisième groupe est supplémenté avec de l'eau sucrée ou avec un régime riche en lipides et en sucres. La veille des travaux pratiques un des deux groupes nourris est mis à jeun pendant 16h. Ainsi 3 groupes sont constitués : un groupe témoin nourri à volonté, un groupe à jeun et un groupe nourri à volonté avec un régime équilibré et de l'eau sucrée ou avec un régime riche en glucides et lipides. Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Les conditions expérimentales ne sont pas susceptibles d'entraîner de douleur et la qualification des expérimentateurs permet d'éviter toutes douleurs lors des manipulations liées à l'entretien des animaux.

L'objectif des travaux pratiques étant de montrer l'induction d'un phénomène physiologique, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaire mais les étudiants seront sensibilisés aux techniques de Remplacement (culture d'hépatocytes et d'adipocytes), la réduction du nombre d'animaux tout en assurant un traitement statistique satisfaisant est possible car trois groupes mettront en commun leurs résultats, les animaux seront en cages collectives et disposeront d'un enrichissement constitué de nids en plastiques aux parois transparentes et un tunnel en carton. Ainsi nous respecterons la règle des 3 R.

13278 Le développement des télécommunications implique l'exposition des populations aux champs électromagnétiques radiofréquence (CEM-RF). Leurs potentiels effets sanitaires sont une préoccupation concernant les organismes les plus fragiles. Par exemple, les femmes enceintes sont continuellement exposées et la période de l'adolescence est une période de forte utilisation du téléphone proche de la tête. Chez le rat, plusieurs études ont suggéré que l'exposition prénatale aux CEM-RF pourrait entraîner des anomalies du comportement à l'adolescence. Ces effets obtenus avec le signal GSM900MHz n'ont jamais été étudiés avec le signal Long Term Evolution (LTE) de quatrième génération. Une différence dans la formation et le positionnement des nouveaux neurones (neurogenèse) pourrait expliquer que des expositions prénatales impactent les comportements de l'adolescent. Ce projet sera réalisé avec un nombre réduit au maximum de 685 rats Sprague-Dawley en 3 procédures et un total de 21 GROUPEs (ANNEXE1).

La procédure 1 visera à mettre en place la technique du 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) pour marquer la neurogenèse dans le cerveau avec 31 rats. Deux femelles gestantes seront reçues au jour gestationnel (J)15 (et 2 extras seront prévues en cas de taille insuffisante des portées), pour faire naître 9 ratons mâles. Ces 9 ratons au stade juvénile (GROUPE1), ainsi que 9 mâles adolescents (GROUPE2) et 9 mâles adultes (GROUPE3) (reçus à l'animalerie) recevront une injection intrapéritonéale de BrdU. Dans chaque GROUPE, les rats seront euthanasiés 2h, 48h et 10 jours après cette injection (n=3 rats par temps d'euthanasie) pour suivre la progression des neurones nouvellement formés. Les rats surnuméraires issus des naissances seront examinés pour les paramètres secondaires (inflammation). Les rates seront euthanasiées après leurs petits pour examiner la neurogenèse (2h à 10 jours après l'injection de BrdU) et/ou les paramètres secondaires.

La procédure 2 visera à tester l'effet des CEM-RF sur la neurogenèse avec 654 rats répartis en 18 GROUPEs. Les débits d'absorption spécifique (DAS) testés sont considérés non toxiques pour l'adulte : SHAM (0W/kg), DAS1 : inférieur, DAS2 : identique aux limites de la commission internationale de protection des rayonnements non-ionisants. La durée des expositions quotidiennes sera fixée entre 45min et 8heures à l'issue de nos résultats *in vitro* sur les cellules

souches du cerveau. Si des effets étaient suggérés avec les groupes exposés aux GSM le signal LTE serait testé de la même façon.

Ainsi, 96 femelles gestantes seront reçues à J2 et 30 extras seront prévues en cas de taille insuffisante de portées, pour faire naître 480 rats mâles. Les rates seront exposées aux CEM-RF pour 1 ou 3 mois à partir de J7 jusqu'à la lactation ou l'âge adulte de la descendance respectivement. Les rats issus de la descendance recevront une injection intrapéritonéale de BrdU à différents stades (juvénile, adolescent et adulte). Les rats seront euthanasiés 2h, 48h et/ou 10 jours après cette injection (selon les résultats de la procédure1). Les petits surnuméraires issus des naissances seront examinés pour les paramètres secondaires sur des échantillons prélevés post-mortem. Les rates seront euthanasiées aux jours 60-70 post-partum pour examiner la neurogenèse 2h à 10 jours après l'injection de BrdU et/ou les paramètres secondaires.

De plus, 48 rats mâles reçus à l'animalerie seront exposés à partir du stade adolescent (environ PND33) durant 1 mois au signal GSM (n=30), et en cas d'effet des GSM, aux LTE (n=18). Au moment de la fin de l'exposition (à environ PND60-70), ils recevront une injection intrapéritonéale de BrdU. Les rats seront euthanasiés 2h, 48h ou 10 jours après cette injection (selon les résultats de la procédure1).

La procédure 3 est la méthode d'euthanasie.

Au plan de la réduction, plusieurs paramètres biologiques seront évalués sur chaque animal, permettant ainsi de minimiser le nombre de rats utilisés. Les coupes de cerveau restantes (après avoir analysé le BrdU) seront exploitées pour valider des résultats par immunohistochimie des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant, deux paramètres qui sont fortement questionnés dans les effets des CEM.

Concernant le raffinement des 2 premières procédures, chaque animal sera observé quotidiennement et pesé au moins une fois par semaine. Des feuilles d'observation permettront de consigner les signes anormaux sur le poids, la posture, les cavités nasales, le pelage, les sécrétions, les membres, les réactions... En période périnatale, une attention particulière sera portée au bien-être des mères et de leur portée et à la nidification. Un animal présentant des signes listés sera suivi à partir d'une grille de scores (ANNEXE2) qui indiquera l'action à prendre de prise en charge de la douleur par analgésie (méloxicam) ou euthanasie (procédure3). De plus, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être. Pendant la période périnatale, les rates seront hébergées seules ou avec leur portée. A partir du sevrage, tous les rats seront hébergés par sexe par groupe à 2 ou 3 animaux par cage pour leur socialisation. Un fond sonore musical sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif. Concernant le raffinement de la procédure 3, les animaux seront sous anesthésie profonde par inhalation d'isoflurane.

Pour ce qui est du remplacement, les approches cliniques, *in vitro* et *in silico*, par leurs limitations éthiques et techniques, ne peuvent pas répondre au questionnement concernant l'examen du positionnement et de la morphologie des nouveaux neurones sur un organisme en interaction sensorielle avec son environnement et doué de thermorégulation, nécessitant de fait le recours aux études *in vivo*.

13279 Les développements récents de l'immunothérapie basée sur la modification des cellules du patient (CAR-T cells) sont en train de révolutionner la prise en charge et le traitement des cancers hématologiques. Il s'agit de modifier/éduquer les cellules immunitaires du patient pour leur permettre de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses. Cependant, le coût élevé de ces traitements, la complexité technique de leur mise en œuvre, les effets secondaires observés mais surtout l'efficacité encore limitée dans le temps entraînent un accès restreint à ces nouvelles thérapies.

Nous proposons une alternative plus sûre et plus efficace aux CAR-T conventionnels grâce à l'utilisation de vecteurs encapsulés directement injectés aux patients qui vont stimuler le système

immunitaire à la lutte contre les cellules cancéreuses de ce même patient. Cette innovation permet de s'affranchir de la production *ex vivo* de ces cellules spécifiques, réduisant ainsi de manière drastique le coût des produits thérapeutiques.

Pour mener à bien ce développement, nous devons entreprendre une étude sur l'animal afin de démontrer la sécurité, la spécificité d'action et l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle technologie.

Après avoir validé sur des modèles cellulaires qu'il était possible de modifier spécifiquement les cellules immunitaires humaines et murines, nous devons vérifier l'innocuité et le devenir des nanoparticules utilisées dans notre projet. Ainsi, nous nous proposons d'injecter les lentivecteurs encapsulés produits dans notre laboratoire et de suivre leur devenir chez la souris (le modèle *in vivo* est indispensable pour mener à bien ce projet). Un marquage spécifique permet de suivre nos nanoparticules au cours du temps, permettant ainsi de réduire de manière importante le nombre d'animaux puisque le produit sera suivi sur 14 jours pour une même souris.

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude approfondie permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus (réduction). Cette étude nécessite 49 animaux au total.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués.

L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien (raffinement).

13280 Notre objectif est d'étudier l'écologie spatiale du puffin de Scopoli (*Calonectris diomedea*) en Méditerranée française. Cette espèce d'oiseaux marins, de la classe des Procellariiformes (pétrels) niche en terrier et se nourrit de petits poissons pélagiques et de zooplancton capturés proches de la surface des eaux côtières. Les puffins sont peu connus du grand public de par leurs habitudes largement nocturnes. Les changements globaux et les modifications anthropiques du paysage, en particulier la raréfaction des ressources marines et le développement éolien offshore menacent leurs populations endémiques à la Méditerranée. Dans ce contexte nous souhaitons suivre les déplacements des oiseaux au moyen d'appareils électroniques (GPS, profondimètres, altimètres). Ces informations seront complétées par des études du régime alimentaire des oiseaux (analyses isotopiques sur des échantillons de plumes) et de la dépense énergétique (utilisation d'un modèle calibré à partir d'échantillons de plumes et de mesures morphométriques des adultes). L'acquisition de données *in vivo* est impérative (pas de substitution possible) et 30 oiseaux seront manipulés au maximum chaque année. Le nombre total manipulé sera donc de 150 pour une période de 5 années. Les tailles d'échantillons annuels pour chaque manipulation ont été déterminées sur la base de nos travaux précédents effectués sur cette espèce et ce même site d'étude au cours de 7 campagnes de terrain précédentes afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et garder une puissance statistique suffisante. Notre étude télémétrique est optimisée de manière à réduire l'inconfort des oiseaux avec des temps de manipulation réduits. L'ensemble de ces mesures participent à la mise en place de la Directive Cadre Stratégie Milieu Marin et permettra d'anticiper les impacts du développement éolien offshore en Méditerranée et de la dégradation/perte d'habitats marins essentiels pour l'alimentation des puffins. Le suivi de la population de puffin de Scopoli, effectué en étroite collaboration avec le Parc National des Calanques, permettra d'améliorer les dispositifs de gestion et de conservation de l'espèce.

13281 La conduction rapide de l'influx nerveux dans les fibres myélinisées repose sur des domaines spécifiques, les nœuds de Ranvier, qui sont répartis de façon régulière le long des prolongements des neurones (axones). Les mécanismes qui régissent l'agrégation des protéines constitutives de ces domaines restent très mal connus. La sclérose en plaque (SEP) est une maladie inflammatoire et neurodégénérative, qui entraîne une démyélinisation progressive des axones du système nerveux central (SNC). Lors d'une démyélinisation, l'organisation des nœuds de Ranvier est

bouleversée, ce qui participe aux atteintes fonctionnelles. En revanche, lors de la remyélinisation, la réapparition de ces domaines semble être très précoce, et participe de façon importante à la restauration de la conduction nerveuse. En utilisant des approches *in vivo* (analyse en temps réel après une démyélinisation expérimentale), nous souhaitons améliorer la compréhension des mécanismes de formation des nœuds, lors du développement et de la remyélinisation, et évaluer leur impact sur la réparation myélinique, afin d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques la favorisant dans la SEP. Nous souhaitons à présent compléter le précédent projet déposé par l'étude sur tissu fixé ou par imagerie en temps réel de lignées de souris transgéniques (permettant la visualisation des structures et cellules d'intérêt par l'expression de marqueurs fluorescents) dans des conditions contrôles ou de démyélinisation (LPC/EAE) afin de caractériser l'interaction entre nœuds de Ranvier et cellules gliales et l'impact de cette interaction. Nous utiliserons environ 450 animaux au cours de ce projet. Le modèle *in vivo* est indispensable pour mener ce projet. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, l'étude *in vivo* est limitée au maximum à la validation de résultats préalablement obtenus *in vitro* et *ex vivo*. Nous réaliserons de plus des études longitudinales permettant d'imager plusieurs fois le même animal. Enfin, les techniques utilisées sont optimisées afin de prévenir stress et douleur chez les animaux, qui sont par ailleurs maintenus dans des environnements enrichis.

13282 Ce projet d'immunisation vise à développer un anticorps performant contre le facteur de différenciation ovarien FOXL2. Le développement d'un anticorps spécifique dirigé contre ce facteur de transcription, cruciale pour la physiologie ovarienne, permettra son étude dans le cadre du projet sous de nombreux aspects : immunofluorescence, western blot, et immunoprécipitation de chromatine. Cette dernière technique nécessite la production d'anticorps de haute spécificité qui ne sont pas à ce jour disponibles ni dans le commerce ni dans d'autres laboratoires de recherche. Nous avons produit un nouvel antigène correspondant à la protéine FOXL2 recombinante délétée du domaine Forkhead, présent dans d'autres protéines de la même famille. L'anticorps qui en résultera nous permettra dans l'absolu de détecter toutes les isoformes de la protéine FOXL2 chez la souris et chez l'humain. A long terme cet anticorps pourra servir d'outil diagnostique pour la détection performante de la protéine FOXL2 dans des formes de cancers ovariens humains comme les tumeurs de granulosa juvéniles et adultes.

Nécessité du recours à l'animal

Cette étude nécessite le développement d'un anticorps spécifique qui permette la détection de ce facteur directement dans les biopsies tumorales (par la technique d'immunohistochimie). A la différence de l'ADN et des protéines, à ce jour il n'existe pas une technologie qui permette de produire un anticorps synthétique à partir d'un antigène donné. D'où la nécessité de produire les anticorps chez des animaux, dans ce cas spécifique chez les lapins, le remplacement par des méthodes alternatives n'est pas possible dans ce cas. Cette méthode est d'utilisation courante pour le développement d'anticorps chez les lapins dans la plupart des laboratoires de recherche en France et dans le monde. Le recours au lapin est peu coûteux, nécessite peu d'investissement humain et permet d'obtenir rapidement une bonne quantité de sérum qui sera suffisante pour les études décrites au paragraphe précédent. Deux lapins au maximum par protocole d'immunisation seront utilisés. Ceci est nécessaire afin de compenser d'une part la perte éventuelle d'animaux qui n'auront pas supporté le protocole d'immunisation, et d'autre part les réponses individuelles trop hétérogènes qui conduiront à l'écart des animaux du protocole. Pour ce protocole d'immunisation, nous utiliserons 2 lapins, qui seront injectés avec un antigène.

Dans le cadre d'une démarche de raffinement, nous n'utiliserons qu'un seul type d'antigène, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. L'utilisation de deux lapins par antigène constitue la quantité minimale d'animaux pour le développement d'un tel protocole.

Nous donnerons les soins pré-, per- et postopératoires adéquats.

Nous donnerons aux animaux des conditions d'hébergement optimums (soins, enrichissement du milieu) dans le but d'augmenter leur bien-être.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse éventuelle suite à l'expérimentation en objet, les animaux seront traités avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par administration orale pendant 5 jours.

13283 Les diverses affections de la colonne vertébrale (dégénératives, traumatiques, tumorales, malformatives ou encore infectieuses) nécessitent parfois la réalisation d'une fusion osseuse entre les vertèbres (arthrodèse). Ce procédé peut en fonction du patient, s'appliquer à différentes zones de la vertèbre, inter-somatique et/ou postéro-latérale.

A l'heure actuelle chez l'humain cette fusion est faite à l'aide de matériel d'ostéosynthèse. Mais afin d'obtenir une fusion correcte, il est nécessaire d'apporter un contact entre des surfaces d'os spongieux, et de réaliser une greffe osseuse. Le chirurgien peut utiliser un greffon osseux prélevé au niveau du bassin par exemple (autogreffe).

Dans le cas de notre projet, nous étudierons la fusion rachidienne postéro-latérale pour laquelle il est fréquent que la fusion ne soit pas obtenue (pseudo-arthrodèse), entraînant douleurs et échecs thérapeutiques. L'autogreffe osseuse est parfois impossible (dans le cadre des tumeurs rachidiennes par exemple ou d'infections) et est grevée de comorbidités (infections ou douleurs).

Différents matériaux ostéo-inducteurs ont été développés afin d'aider la fusion osseuse ou l'ostéogénèse. Le bio-verre en fait partie, c'est un matériau résorbable constitué de cristaux ayant la propriété de lier les protéines osseuses. Des études parcellaires montrent une fusion rachidienne plus précoce après ajout de bio-verre à l'autogreffe et/ou une densité osseuse au scanner significativement plus élevée. Pour autant les résultats d'histologie restent discordants.

Notre projet, en deux phases, est de réaliser une étude préclinique interventionnelle afin de comparer les taux de fusion rachidienne postéro-latérale avec ou sans utilisation de bio-verre chez le rat. Les rats seront opérés au niveau de la colonne vertébrale, juste au-dessus du bassin, sous anesthésie générale profonde avec analgésie et deux vertèbres seront fusionnées, avec ou sans biomatériau/autogreffe prélevé sur l'os de la hanche. Cette intervention devrait se traduire par une gêne légère et passagère, les animaux seront traités contre la douleur et surveillés pendant 8 semaines au cours desquelles leur état de santé sera vérifié de même que leur capacité de mouvement, avant de vérifier post-mortem l'état de fusion des vertèbres. Aucune limitation durable de posture ou à la locomotion n'est attendue.

L'étude pilote vise à calibrer le protocole de recherche (taille des lots) et à déterminer la validité de l'approche envisagée. La seconde phase vise à valider l'impact du bio-verre dans la récupération clinique et fonctionnelle, mais également au niveau tissulaire (histologie). Ce projet implique un maximum de 26 rats et répond aux principes des 3Rs :

-Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est ramené au minimum mais permet dans un premier temps de faire la preuve du concept en donnant une orientation à la seconde phase. Une évaluation statistique permet alors de réduire le nombre des animaux utilisés.

-Réduction de la douleur, souffrance et raffinement : ce projet nécessite une chirurgie lourde pour l'animal. Un protocole de prise en charge de la douleur sera mis en place et pré-opératoire et post-opératoire. Il sera possible de suivre quotidiennement et individuellement chaque animal afin de déterminer les points limites adaptés ainsi que de raffiner le nursing et les traitements adjuvants, qui seront mis en œuvre dans la seconde phase. Les animaux sont maintenus en groupes de deux après récupération complète de l'intervention. La nourriture et l'eau leur sont rendues accessibles sans qu'ils aient à se dresser sur leurs pattes.

-Remplacement : l'étude de la fusion rachidienne avec ou sans greffon met en œuvre des mécanismes physiologiques qui ne peuvent être reproduit *in vitro*.

13284 Les travaux sur la saisonnalité, bien que peu nombreux, sont d'une utilité majeure pour le domaine agro-économique dans lequel les débats sur la suppression des traitements hormonaux pour les productions issues d'animaux d'élevage prennent de plus en plus d'importance. Ces productions (viande, lait, œufs, fromage) étant souvent dépendantes de la saison, la compréhension des mécanismes par lesquels les contraintes environnementales agissent sur les fonctions biologiques

des espèces est donc nécessaire pour la création d'élevages non traités. Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent l'importance des variations saisonnières et de leur impact physiologique chez l'humain. L'étude de l'intégration de ces facteurs saisonniers dans le système nerveux constitue donc un premier pas vers une meilleure connaissance des mécanismes par lesquels l'humain est affecté par les variations annuelles de facteurs tels que la lumière ou la température. Depuis longtemps nous savons que l'expression de certaines protéines en lien avec la reproduction et le métabolisme varient fortement entre les saisons chez les espèces saisonnières comme le Hamster. Particulièrement, dans l'hypothalamus, des études ont permis de mettre en évidence de fortes différences en terme de nombre de neurones exprimant ces protéines, visibles entre une photopériode longue (printemps-été) et une photopériode courte (automne-hiver). Or, que ces différences de neurones marqués viennent de la variation de l'expression de gène ou d'une balance de création-déplétion de ces neurones entre les saisons reste indéterminé. Depuis quelques années seulement nous savons que l'hypothalamus constitue une niche neurogénique pouvant générer de nouveaux neurones à partir de cellules indifférenciées.

Nous souhaitons donc tester l'hypothèse que lors du passage des saisons, l'hypothalamus serait soumis à une régulation des neurones impliqués dans les fonctions du métabolisme et de la reproduction, via une mort neuronale (apoptose) et une création de nouveaux neurones (neurogenèse) photopériode-dépendantes. Pour ce faire, nous devons injecter du BrdU, un marqueur des neurones nouvellement créés, quelques heures avant de mettre à mort les animaux afin de pouvoir étudier la genèse de nouveaux neurones dans l'hypothalamus en fonction de la photopériode.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche expérimentale sur animaux. Les mécanismes saisonniers font intervenir des voies de signalisation complexes dans différents types cellulaires, tissus et organes, nous empêchant donc de travailler sur un modèle *in vitro* en remplaçant les animaux par des cellules isolées.

Toutes les estimations pourront être revues à la baisse concernant le nombre d'animaux pour les tests si leur nécessité pour l'expérience n'était pas justifiée.

D'après les connaissances sur le modèle animal et les techniques utilisées, le nombre d'animaux par groupe est fixé à $n=7$ pour obtenir des résultats statistiquement significatifs ($p<0.05$) en utilisant des tests paramétriques et/ou non paramétriques. Nous avons établi qu'un total de 180 hamsters Syriens mâles (12 pour les tests et 168 pour les expériences de changement de photopériode) sera utilisé pour cette expérience pendant les 5 ans. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés dans nos expériences, les hamsters inclus dans cette étude seront récupérés d'une autre expérience pour laquelle nous produisons beaucoup de jeunes hamsters et n'utilisons que les femelles.

En termes de raffinement, les hamsters seront hébergés dans des cages types III, en fratries, avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum*, le milieu sera enrichi avec du matériel de nidation et un barreau à ronger. Une attention particulière sera portée à la réduction de la douleur et du stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, injection conforme aux bonnes pratiques d'expérimentation animale). Un stress excessif ou une douleur prolongée pourraient modifier les processus de formation de nouveaux neurones et de mort neuronale compromettant ainsi l'expérience. Le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux. Les animaux seront suivis après la procédure pour s'assurer de leur bien-être, leur état de santé sera évalué au moyen d'une grille établissant des points limites bien définis. En cas de dépassement de ces points limites, les animaux seront retirés du protocole et un traitement adapté pourra être mis en place ou une mise à mort de l'animal si nécessaire.

13285 L'évaluation de la toxicologie préclinique est l'étape la plus critique du développement d'un médicament, représentant environ 20% du coût total du développement du médicament. Environ 70% des programmes de développement de médicaments échouent en raison d'une toxicité ou de problèmes inattendus lors de la validation de phase 1 sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) chez l'homme. Ceci est principalement dû à plusieurs inconvénients des outils de tests précliniques actuels. Notre société propose un service basé sur une plateforme de souris

HIS (Humanized Immune System) à des clients du domaine du privé mais également académiques, afin qu'ils puissent effectuer les tests précliniques de leurs composés sur un modèle animal à la fois robuste et fiable.

La souris au foie humanisé fournit un modèle de souris possédant un foie humain fonctionnel. Le protocole consiste à remplacer les cellules hépatiques de souris de la souris immunodéficente par des cellules hépatiques humaines (hépatocytes). Ce remplacement est effectué par greffe d'hépatocytes humains dans une souche de souris receveuse. Ce modèle de souris foie humanisée sera également utilisé pour caractériser l'efficacité de candidats médicaments visant à guérir les infections virales (hépatite) ou le cancer du foie.

REDUCTION :

Dans ce projet, un nombre maximum de 5000 souris seront humanisées

Chaque étude préclinique visant à tester l'efficacité d'un candidat médicament nécessite entre 50 et 100 animaux (Au minimum 4 groupes seront nécessaires pour la bonne conduite de chaque étude préclinique (3-5 doses du candidat médicament, contrôle négatif, contrôle positif). Les études précliniques des candidats-médicaments nécessitent l'utilisation de 8 à 10 individus par group testé. Ce nombre nous permet de d'avoir des résultats statistiquement interprétables et éviter de refaire les études et ainsi limiter le nombre d'animaux totale utilisés.

RAFFINEMENT :

Les souris seront monitorées quotidiennement et pesée hebdomadairement pour s'assurer de leur état général. Une perte de plus de 20% de leur poids initial sera considérée comme une raison de mise à mort. De même, si un animal présente des signes de prostration, de difficultés locomoteurs ou des difficultés à s'alimenter, il sera mis à mort immédiatement.

Les animaux seront hébergés dans une animalerie de classe A2 par 5 à 6 animaux par cage ventilée. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatations dans leurs cages d'une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont hébergés avec à un cycle lumière-obscurité de 12h / 12h (07 :19h). Les animaux sont acclimatés à la présence de l'expérimentateur qui les pèse et les examine tous les jours. L'eau de breuvage (stérile) ainsi que la nourriture (stérile) sont fournies ad libitum. Pour réduire et éviter le stress et assurer le bien-être des animaux, chaque cage est enrichie avec des objets (cabane en carton) et la litière de chaque cage est changée régulièrement.

REMPACEMENT :

Le métabolisme et les maladies du foie ne peuvent être mimées de manière adéquate (prédictive de la réponse humaine) que dans un modèle utilisant la souris de laboratoire. A ce jour, il n'est pas encore possible de modéliser ces fonctions *in vitro*. Dès lors, la souris au foie humanisée constitue le seul modèle valable, robuste et prédictif pour tester la sécurité et l'efficacité de nouveaux médicaments.

13286 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, concomitantes d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est actuellement le seul modèle permettant d'étudier le système immunitaire et reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Différents modèles animaux ont été décrits pour étudier ce syndrome dont la dynamique reste encore complexe. Un modèle murin est particulièrement décrit pour reproduire le plus fidèlement

possible les mécanismes biologiques observés chez l'Homme, décrits ci-dessus. Il s'agit du modèle CLP (Caecal Ligation and Puncture), basé sur la ligature et la perforation du cæcum sans obstruer l'intestin des animaux. Ce modèle combine la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien mimant fidèlement les ruptures d'appendice et les diverticulites perforées rencontrées chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire et la phase d'immunodépression.

De précédents travaux ont montré que le modèle murin CLP induisait des paramètres caractéristiques de l'immunodépression du système immunitaire adaptatif et inné tels que ceux observés chez le patient septique. Les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative ont des rôles différents, mais complémentaires, dans l'instauration de la réponse immunitaire. En effet, à la suite d'une infection, la réponse innée représente la première ligne de défense de l'organisme et précède donc la réponse adaptative. Restaurer le système immunitaire inné chez l'animal ou le patient septique représente donc un intérêt médical majeur.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de produits thérapeutiques à restaurer la réponse immunitaire innée de l'animal immunodéprimé suite à un épisode septique.

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ceci permettrait aux patients de restaurer leur système immunitaire et ainsi prévenir les infections secondaires pouvant leur être fatales.

Règle des 3R: Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant l'immunodépression à la suite d'un sepsis n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats en tenant compte des études précédentes. Des groupes de souris contrôles serviront de contrôle de chirurgie et le système immunitaire des souris septiques sera comparé à celui de ces souris contrôles non-septiques.

Un suivi d'éléments physiologiques et comportementaux des animaux aura lieu deux fois par jour et tout au long de la procédure afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis et affinés grâce aux études précédentes (ex : température corporelle). Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. La température à l'intérieur des cages sera réchauffée grâce à une armoire chauffante ou des matelas chauffants jusqu'à 3 jours après chirurgie. Des aliments secs, humidifiés et de l'eau gélatinisée seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 432 maximum. Cependant, dès qu'une expérience permettra d'obtenir les résultats escomptés, le projet prendra fin, afin de ne pas utiliser l'intégralité des animaux.

13287 La maladie de Parkinson se situe au second rang des maladies neurodégénératives les plus communes. Elle se caractérise par la dégénérescence de neurones du cerveau qui synthétisent et libèrent la dopamine. La dopamine est un neurotransmetteur c'est-à-dire une molécule qui transmet des informations entre deux neurones. Ces neurones à dopamine font partie d'un ensemble de réseaux de neurones du cerveau, appelés ganglions de la base, responsables de la mémoire des mouvements appris.

Les symptômes majeurs de la maladie de Parkinson sont des troubles moteurs comme la lenteur à initier des mouvements, la rigidité musculaire et les problèmes d'équilibre. La mémoire motrice est atteinte : les malades sont dans la difficulté à mobiliser dans le présent les compétences motrices qu'ils ont apprises et parfaitement exécutées dans le passé. Ceci résulte d'un dysfonctionnement des ganglions de la base. En effet, pour fonctionner correctement les ganglions de la base ont besoin de dopamine. Quand les neurones qui apportent la dopamine aux ganglions de la base disparaissent, les ganglions de la base dysfonctionnent et la maladie de Parkinson s'installe.

Nos études se situent dans le cadre général de l'identification des populations de neurones qui dysfonctionnent dans les ganglions de la base dans un modèle souris de la maladie de Parkinson. Notre équipe a récemment montré le dysfonctionnement d'un nouveau type de neurone, qui libère deux neurotransmetteurs à la fois, l'acétylcholine et le GABA. L'objectif du présent projet est de caractériser plus avant ces neurones appelés CGINs (pour Cholinergic-GABAergic interneurons) : quand naissent-ils pendant la vie embryonnaire, comment se distribuent-ils dans les ganglions de la base, avec quels autres neurones se connectent-ils, dans quelles structures des ganglions de la base dysfonctionnent-ils en l'absence de dopamine, peut-on empêcher leur dysfonctionnement par un médicament ?

Il s'agit d'une recherche fondamentale et préclinique dont nous estimons la durée à quatre années. Mais c'est aussi une recherche préclinique puisque nos premiers et précédents résultats vont déjà donner lieu au test d'un médicament en phase II, dans quatre centres Parkinson en France. Cela pourrait aboutir à un nouveau traitement qui serait administré en plus de celui donné actuellement et qui est basé sur le remplacement de la dopamine manquante.

Le modèle animal sur lequel nous travaillons est le modèle souris. Pour repérer la date de naissance des neurones d'intérêt, nous gavons des souris gestantes à des dates particulières de la gestation avec une molécule qui marque les neurones nés le jour de l'injection. Pour fabriquer un modèle souris de la maladie de Parkinson, nous injectons directement dans le cerveau de souris adultes une toxine qui fait dégénérer uniquement les neurones à dopamine. Nous travaillons *in vitro*, sur des tranches de cerveau de souris soit témoins soit gavées ou opérées.

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

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

Réduction : Nous ferons des expériences sur 45 souris femelles gestantes, 180 souriceaux mâles et femelles et 116 souris mâles soit un total de 341 souris. Afin de réduire au minimum ce nombre, c'est-à-dire de ne pas faire d'expériences inutiles ou en doublons, nous avons planifié nos expériences pour étudier le plus de critères possibles sur les mêmes cerveaux et nous analyserons nos résultats au fur et à mesure. Nous avons aussi calculé ce nombre d'animaux pour avoir des résultats statistiquement valides c'est-à-dire obtenus sur des échantillons qui ne soient ni trop petits ni inutilement trop grands.

Raffinement : Nous ferons très attention à la douleur des souris et à leur stress. Pour éviter la douleur lors des gavages, nous employons une canule à bout rond afin d'éviter toute blessure. L'utilisation de l'huile de maïs pour dissoudre la substance injectée permettra l'introduction aisée de la canule dans l'œsophage. Le volume introduit sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de l'estomac. Après gavage, les femelles gestantes seront hébergées en cages individuelles équipées, en plus de l'enrichissement de base, de matériaux de nidification, pour leur permettre de récupérer et de se préparer à la mise-bas. Pour éviter la douleur lors de la chirurgie (incision de la peau du crâne et percement de deux petits trous dans la boîte crânienne), nous anesthésierons et analgésierons profondément les souris et contrôlerons leur température, respiration et calme pendant toute la chirurgie. Avant leur réveil nous leur donnerons une dose d'analgésique pour qu'elles ne souffrent pas. Après leur réveil et jusqu'à leur mise à mort pour le prélèvement des cerveaux, nous les observerons quotidiennement pour repérer les signes de souffrance (mesure poids, aspect et comportement). Pour éviter le stress, avant et pendant les expériences, les souris seront hébergées dans des cages standards enrichies (placement de buchettes de bois, dôme-home, nids-végétal ou tunnels dans les cages), et dans un environnement avec température, hygrométrie et lumière contrôlées (cycles 12 heures jour/ 12 heures nuit). Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau.

13288 L'arthrose est une maladie articulaire chronique très invalidante et douloureuse conduisant à la destruction du cartilage. Il ne s'agit pas d'usure mais bien d'un syndrome destructeur qui est associé à un contexte inflammatoire qui touche non seulement le cartilage, mais s'étend également aux autres structures de l'articulation (os, membrane synoviale). Plusieurs formes d'arthrose prédominent selon l'âge, l'instabilité mécanique, l'obésité ou un traumatisme articulaire.

Cette pathologie, dans son ensemble, constitue une des formes les plus courantes de rhumatisme avec, dans le monde, en 2016, 250 millions de patients atteints, un nombre qui devrait doubler d'ici 2035. Elle reste la première cause de handicap chez les personnes de plus de 40 ans et est responsable d'une part importante des arrêts de travail.

Problème majeur de santé publique, l'arthrose ne peut toujours pas être soignée. Hormis les traitements symptomatiques de la douleur (antalgiques) et de l'inflammation (anti-inflammatoires), il n'existe aucun moyen d'en guérir ou de prévenir son installation chez un individu à risque.

Nous avons récemment démontré que les rats de la souche SHHF porteurs d'une mutation dans le récepteur de la leptine (SHHFcp/cp) souffrant d'un syndrome métabolique ou SMet caractérisé par une obésité, une insulino-résistance, une hyperglycémie, une hypertension et une dyslipidémie, développe des lésions arthrosiques sévères à 12,5 mois de vie alors que leur contrôle appelé SHHF+/+ ne développe ni un SMet ni une arthrose à ce même âge. En utilisant ce modèle unique d'arthrose métabolique nous avons pu démontrer qu'un traitement préventif avec une molécule aux effets bénéfiques sur le SMet pouvait également empêcher l'apparition d'une arthrose métabolique dans ces conditions. Bien que prometteur, ces résultats demandent à être validés en démontrant que cette molécule déjà utilisée en cardiologie, peut également avoir des propriétés curatives originales dans le domaine de l'arthrose métabolique.

Pour réaliser cette étude, nous devons 1) caractériser la cinétique d'apparition de l'arthrose dans notre modèle de rats SHHF afin de caractériser les stades débutants de l'arthrose, 2) utiliser cette information pour traiter avec notre molécule ou un placebo des rats avec une arthrose débutante, et 3) tester si les effets bénéfiques de la molécule peuvent également être retrouvés dans une arthrose d'étiologie différente à savoir une arthrose post-traumatique induite par chirurgie.

Pour cela, 175 rats de la souche SHHF répartis en 35 SHHF+/+ et 70 SHHF+/cp minces sans Smet et 70 rats SHHFcp/cp obèses avec SMet séparés en 2 lots eux même séparés en sous-groupe seront utilisés dans cette étude :

Lot 1 (4 semaines de vie) de 15 rats SHHF+/+, et 30 rats SHHFcp/cp pour étudier la cinétique d'apparition de l'arthrose métabolique et de 30 rats SHHF+/cp pour celle de l'arthrose traumatique

Lot 2 (4 semaines de vie) de 20 rats SHHF+/+, et 40 rats SHHFcp/cp pour le traitement curatif de l'arthrose métabolique et 40 rats SHHF+/cp pour le traitement curatif de l'arthrose traumatique

Remplacement : l'animal est indispensable car les effets à observer touchent plusieurs sites articulaires et ont des implications sur de nombreux organes.

Réduction : basé sur nos études précédentes, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum tout en conservant la puissance statistique nécessaire et suffisante pour répondre rigoureusement aux questions posées.

Raffinement : une surveillance quotidienne (prise de poids) et les points limites ont été déterminés pour s'assurer de l'absence de douleur des procédures légères et modérés (anesthésie, traitement antalgique post chirurgical).

Les animaux seront stabulés à 3 par cages de 900 cm² puis transférés à 3 dans des cages de 1500 cm² dès qu'ils auront atteint le poids de 300 g. Toutes les cages seront enrichies avec des bûchettes en peuplier avec un tunnel en carton ou en polycarbonate.

13289 Les effets cardiovasculaires d'un nouveau candidat médicament sont étudiés chez l'animal vigile par télémétrie pour éviter les interférences avec les effets des anesthésiques. De plus, cette technique permet de limiter l'utilisation d'animaux car elle donne la possibilité de réutiliser les animaux pour étudier successivement des produits différents après une période de repos entre deux études. Cependant, la télémétrie ne permet pas d'effectuer d'études approfondies de la fonction

cardiovasculaire dans la mesure où cette technique se limite à l'enregistrement de la pression artérielle et de l'électrocardiogramme dans les études précliniques réglementaires requises pour le passage en phase I clinique.

Dans certains cas, il est nécessaire de conduire des études approfondies pour mieux évaluer des paramètres qui ne sont pas accessibles par télémétrie ou pour évaluer un aspect particulier de la fonction cardiovasculaire. Ces paramètres sont le volume d'éjection systolique, le débit cardiaque, la force des contractions du ventricule gauche, le débit artériel coronaire et la pression artérielle pulmonaire pour ne citer que les plus importants. Ces études sont réalisées chez l'animal anesthésié selon une procédure sans réveil. Certaines études sont réalisées *ex vivo* après prélèvement de tissus cardiaques ou vasculaires comme l'étude des effets sur l'activité électrique des fibres de Purkinje isolées ou l'étude des effets sur la contraction d'artères isolées.

Ces études ne sont pas systématiques et sont relativement peu fréquentes mais elles sont exigées par les autorités réglementaires en cas de suspicion d'un effet délétère identifié lors des études par télémétrie ou lors d'effets inattendus au cours d'études de toxicologie précliniques ou d'études cliniques.

Ces études sont réalisées au bénéfice des patients incorporés dans les essais cliniques ou post commercialisation pour prévenir des effets indésirables potentiellement graves. Ce risque dépend beaucoup du profil de la population de malades à laquelle s'adresse le médicament. Par exemple, un candidat médicament qui s'adresserait à des patients insuffisants cardiaques ne doit en aucun cas diminuer les performances de la fonction cardiaque sous peine d'entraîner une surmortalité.

Le chien est l'espèce la plus utilisée pour ce type d'étude car elle est la plus fréquemment utilisée pour les études précliniques réglementaires par télémétrie requise pour le passage en phase I clinique. Toutefois, en fonction du contexte, d'autres espèces peuvent être utilisées comme le rat, le cobaye, le lapin ou le macaque cynomolgus pour expliquer par exemple une surmortalité dans une étude de toxicologie préclinique réalisée avec l'une de ces espèces.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement spécifique à chaque espèce.
- les procédures d'anesthésie incluent des protocoles visant à réduire l'anxiété pré-opératoire et des protocoles antalgiques pour prévenir tout signe de douleur pendant la phase d'anesthésie.
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.

Ces procédures sont toutes des procédures sans réveil. En termes de souffrance, la sévérité est légère car l'acte susceptible de générer le niveau de douleur le plus élevé est constitué par l'injection intraveineuse nécessaire à l'anesthésie générale.

Compte tenu de la fréquence à laquelle ces études sont demandées, le projet prévoit 100 chiens, 50 macaques cynomolgus, 50 lapins, 400 rats et 100 cobayes au maximum sur la durée de 5 ans du présent projet

13290 Le projet a pour objectif d'évaluer l'impact physico-chimique d'un aliment sur l'amélioration de la santé bucco-dentaire (gencives, plaque, tartre) chez le chien. Un plan expérimental croisé a été développé pour réduire au minimum le nombre d'animaux pour cette étude. Compte tenu de l'objectif du projet, Il n'est pas possible de remplacer l'animal par une méthode alternative. Dans les conditions de l'étude, il a été calculé qu'il était nécessaire d'utiliser un minimum de 16 chiens par l'aliment testé afin de mettre en évidence des différences statistiques significatives. Les techniques de mesure impliquée ne sont pas invasives et ne provoquent pas de douleur. Dans le cadre de cette étude, les animaux seront soumis à une anesthésie. Celle-ci est nécessaire pour procéder au détartrage des dents avant le démarrage de l'étude, et lors de l'évaluation du niveau de formation de la plaque et du tartre. Elle a également pour but de réduire toute angoisse ou tout stress qui

pourrait être ressenti par l'animal au moment du détartrage ou lors de l'évaluation bucco-dentaire. Par ailleurs, pendant toute la durée du projet, les chiens pourront continuer de bénéficier d'un niveau élevé de contacts sociaux quotidiens avec leur congénère et leur personnel soignant (sorties en parc avec d'autres chiens, promenade, toilettage) contribuant ainsi à appliquer un niveau de bien-être correspondant au niveau courant appliqué. Les détartrages effectués lors de cette étude seront comptabilisés dans le programme annuel de médecine préventive. En effet, celui-ci prévoit un à deux détartrage(s) annuel si besoin. Ceci évitera une nouvelle anesthésie dans le cadre des soins courants des chiens. Ce projet contribue au développement d'aliments destinés à améliorer la santé bucco-dentaire des chiens.

13291 Les hormones thyroïdiennes (HTs) contrôlent de nombreux processus biologiques en régulant l'expression de nombreux gènes. Des perturbations de la signalisation de ces hormones sont à l'origine de diverses pathologies qui peuvent se manifester tout au long de la vie et donc constituent des problèmes majeurs de santé publique. L'étude de ces régulations par les HTs constitue donc un axe de recherche important, que nous avons voulu aborder au travers d'un TP d'une semaine proposé aux étudiants de Master 2.

L'objectif de ce TP porte sur l'étude des régulations transcriptionnelles induites par les HTs en parallèle chez deux modèles animaux, la souris (mammifère) et le xénope (amphibien). Il s'agit d'étudier l'implication des HTs dans la régulation de l'expression de gènes cibles *in vivo* chez le têtard et chez la souris nouveau-née, c'est à dire dans un contexte intégré qui permet de prendre en compte la physiologie de l'animal dans l'étude de ces régulations. L'analyse comparée chez ces deux modèles nous permet d'aborder les notions de régulation positive et négative de la transcription par une hormone.

La présente demande d'autorisation concerne la partie expérimentale du TP réalisée sur les têtards de xénope : il n'est pas possible de remplacer le modèle xénope par une méthode alternative.

Le genre *Xenopus* est un modèle animal particulièrement adaptés aux études physiologiques relatives au rôle des HTs dans l'organisme. La métamorphose, qui correspond au passage de l'état de têtard à l'état adulte, est régulée par les HTs et présente de nombreuses similitudes avec la période périnatale chez les mammifères.

Les têtards utilisés sont conservés en balnéation dans une eau déchlorée et filtrée à température ambiante de 18-20°C, avec un cycle lumière/obscurité 12h/12h. Ils sont hébergés par 20 dans des aquariums de 20 litres, nourris régulièrement, ainsi que les paramètres de l'eau contrôlés, jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade pré-métamorphique ; ils sont alors utilisés pour l'expérimentation.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet :

Compte tenu de la variabilité biologique intrinsèque aux expériences *in vivo*, pour que les observations soient représentatives il est nécessaire d'utiliser un minimum de dix animaux par condition étudiée. Notre recul sur ce type de protocole expérimental montre que des groupes de 10 animaux par condition sont nécessaires et suffisants afin d'obtenir des données statistiquement significatives.

Schématiquement, la procédure de « Transfert de gène *in vivo* » employée chez le xénope consiste à injecter une solution contenant un ADN exogène dans le muscle d'un têtard anesthésié avec du MS222, qui est la méthode d'anesthésie standard utilisée par balnéation chez toutes les espèces aquatiques en vue de pratiquer une intervention sur l'animal (observation, manipulation, acte chirurgical, injection). De plus, seul cet anesthésique est utilisé afin de ne pas traumatiser les animaux par une injection supplémentaire d'analgésique avant l'injection de plasmide, car deux injections intramusculaires successives pourraient entraîner des dégâts importants au niveau du tissu musculaire. Cependant, il est reporté dans certains travaux que le MS222 aurait aussi une action analgésique, au moins au niveau de la peau. Suite à l'injection, les animaux font l'objet d'une surveillance continue et tout têtard montrant des signes de souffrance est immédiatement euthanasié.

Dans le cadre du TP, la construction plasmidique comprend soit un promoteur inductible par les HT placé devant un gène rapporteur de l'activité de ce promoteur, soit la même construction

plasmidique mais dont le promoteur est muté pour ne plus répondre aux HTs. Les deux groupes injectés sont ensuite soit traités avec des HTs à la concentration de $5 \times 10^{-9} \text{M}$, soit non traités. Ainsi, 2 constructions (mutée vs non mutée) x 2 conditions (traitement HT vs non traité) x 10 têtards par groupe = un total de 40 animaux sont utilisés dans ce projet d'enseignement.

Avantages et dommages escomptés :

La possibilité de faire une analyse comparée en utilisant deux modèles animaux pour étudier la régulation transcriptionnelle par les HTs dans un contexte intégré, c'est à dire en tenant compte de la physiologie propre de l'animal, est une opportunité unique qui ne peut être atteinte dans des études *in vitro*. Cette procédure réalisée en routine au laboratoire depuis plus de 20 ans forme l'ossature de l'atelier de Master 2 depuis 2004 qui rencontre une forte demande chaque année car ce type d'atelier est rarement proposé dans les cursus étudiants.

Les étudiants qui viennent pratiquer ce TP sont généralement novices ; cependant, cette mise en situation, contrôlée par un solide encadrement de l'équipe organisatrice, permet d'aborder des notions d'éthique, de statistiques et de règles (3R) qui sont très appréciées par les étudiants.

13292 En France en 2017, on estime à 400 000 le nombre de nouveaux cas de cancer diagnostiqués et à 150 000 le nombre de décès. Chez la femme, le cancer du sein reste le plus fréquent. La dissémination métastatique est à l'origine de l'essentiel des décès liés au cancer. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la progression tumorale restent encore mal connus et l'identification de nouvelles voies de signalisation qui déterminent l'invasion tumorale est donc essentielle pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les cancers du sein métastatiques.

La surexpression de gènes de la famille Bcl-2 est liée à un mauvais pronostic dans plusieurs types tumoraux. Dans certains cas, l'expression de ces gènes n'aurait pas de conséquences sur la formation de la tumeur primaire mais augmenterait le potentiel métastatique des cellules. *In vitro*, il a été montré que la délétion de gènes de la famille Bcl-2 inhibait de façon importante la migration des cellules tumorales mammaires, processus largement impliqué dans l'apparition des métastases. Le mécanisme impliqué dans ce processus a été identifié, et met en évidence le rôle clé de ces gènes entre métabolisme cellulaire, mort cellulaire et migration cellulaire. Pour tenir compte du microenvironnement tumoral, les études chez l'animal s'avèrent indispensables pour valider *in vivo* les effets des protéines de la famille Bcl-2 sur la migration cellulaire.

Dans ce projet, 5 gènes de la famille Bcl-2 seront étudiés. Le modèle *in vivo* n'est pas remplaçable dans ce cas précis. Pour un gène étudié, 30 souris seront utilisées et réparties dans 3 groupes. Pour les 5 gènes, au maximum 150 souris seront utilisées sur une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Ces souris seront greffées avec une lignée de cellules mammaires, dont l'expression du gène d'intérêt aura été ou non modifiée. Lorsque la tumeur atteint un volume de 90mm^3 , cette dernière sera réséquée, et la progression métastatique sera suivie par imagerie.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés par cage de 5 individus. Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale et après administration d'un analgésique.

L'administration d'anesthésiques et d'analgésiques, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Un suivi longitudinal par imagerie de la progression des métastases permet une réduction du nombre de souris.

A l'issue de ce projet, si le rôle des membres de la famille Bcl-2 est validé dans l'apparition des métastases, ces voies de signalisation pourront être analysées en tant que cible thérapeutique potentielle dans le cadre du cancer du sein métastatique.

13293 Ce projet vise à identifier de nouveaux éléments à l'initiation du développement de cancers colorectaux. Des données récentes ont permis de montrer l'éventuelle implication d'une voie métabolique dans l'altération de l'homéostasie des cellules intestinales. Plus précisément, l'une des enzymes de cette voie, bien qu'indétectable par immunohistochimie dans l'épithélium intestinal sain,

est détectée dans les lésions pré-malignes et les tumeurs colorectales. Ces données ont mené à évaluer son éventuelle fonction dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Un projet en ce sens a été déposé et validé par le comité d'éthique. Sachant que la délétion du gène était décrite comme n'étant associée à aucune pathologie particulière chez la souris, il était présumé que sa perte de fonction dans les cellules intestinales ne s'accompagnerait d'aucun phénotype dommageable. Pour autant, les expériences menées à ce jour montrent que ce n'est pas le cas si la délétion du gène est induite chez des souris âgées de plus de quatre mois. Ces dernières présentent des altérations au niveau de la vessie évoluant vers une amylose. En conclusion, les colonies de souris ne présentent pas de phénotype dommageable. Seules les souris pour lesquelles la recombinaison est induite entrent dans une procédure de degré modéré. L'objectif de ce projet est de comprendre les fonctions de cette protéine dans des conditions physiologiques pour ensuite mieux évaluer les conséquences que pourrait avoir une altération de son expression sur le développement de tumeurs colorectales. Cet objectif nécessite de modifier la procédure de telle sorte à étudier ce phénotype dommageable en cherchant à minimiser au maximum la douleur des animaux.

Le nombre d'animaux inclus dans la procédure est réduit à minima pour répondre de manière statistique aux questions scientifiques. Leur observation trois fois par semaine (palpation, analyse de comportement) avec pesée hebdomadaire, l'utilisation d'analgésique et un suivi longitudinal par échographie pour définir le point limite le plus précisément et le plus tôt possible sont proposés pour s'assurer du bien-être animal. Aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux n'existe à ce jour. Les animaux seront élevés dans les conditions optimales pour l'espèce.

Nombre de souris totales pour la procédure : 88

13294 Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe hétérogène de tumeurs (50 histotypes différents) affectant chaque année 4500 adultes et enfants, le décès survient dans près de 50% des cas parce qu'il y a très peu de traitement à la disposition des médecins.

En effet, à l'heure actuelle de nombreuses thérapies ciblées sont développées et testées chez des patients atteints de cancer (colon, sein, poumon) mais peu d'essais sont réalisés chez des patients atteints de sarcome à cause de la rareté des modèles pré-cliniques (cellules *in vitro* et modèles de souris). Le développement de modèles pré-cliniques pour l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu crucial.

Notre équipe est localisée dans un institut qui est centre de référence dans le traitement de ce cancer rare et nous avons donc la possibilité d'obtenir des tumeurs de patients et ainsi de pouvoir développer des lignées cellulaires et des modèles de souris xénotransplantées avec ces tumeurs. Celles-ci vont nous permettre de tester des médicaments et combinaisons de médicaments pour lesquels nous avons des données bibliographiques dans d'autres types de cancer. Les tests seront d'abord réalisés sur des cellules en culture et dans la mesure où ils sont concluants, ils seront réalisés sur des souris sur lesquelles on aura implanté une tumeur de patient (modèle PDX). Nous allons nous focaliser sur les 3 histotypes les plus représentés : liposarcomes dédifférenciés (LPS), leiomyosarcome (LMS) et sarcomes pléomorphes indifférenciés (UPS) et nous souhaiterions inclure 5 patients pour chacun des histotypes.

Des données préliminaires obtenues dans notre laboratoire nous conduisent à nous intéresser à des thérapies qui agissent sur des cibles spécifiques (thérapies ciblées) seules ou en combinaison avec une chimiothérapie standard (la gemcitabine ou doxorubicine).

Ces expérimentations *in vivo* ne sont pas remplaçables par une méthode alternative et s'inscrivent dans un projet de recherche translationnelle qui vise à élargir l'éventail thérapeutique dans le traitement des sarcomes des tissus mous, elles sont essentielles avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme. Toutes les expérimentations sont réalisées par du personnel qualifié, le nombre de souris est limité au maximum, le but étant d'obtenir des données significatives d'efficacité du médicament. Les animaux sont surveillés par le personnel de l'animalerie quotidiennement et sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée est enrichi par des tunnels en polycarbonate. Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Les

animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou postopératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

Ce projet nécessitera l'implantation de 1755 animaux sur 3 ans.

13295 Ce projet s'inscrit dans un contexte de recherche préclinique sur les traitements de la douleur neuropathique. Celle-ci est par définition consécutive à une lésion ou une pathologie du système nerveux. Elle affecterait, en France, environ 6% de la population. Certains antidépresseurs et anticonvulsivants représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles. Cependant ils ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux. De plus, le mécanisme d'action de ces deux classes pharmacologiques dans le soulagement de la douleur neuropathique est, pour l'heure, encore mal connu.

Comprendre le mécanisme sous-jacent à l'action thérapeutique des antidépresseurs mais également des anticonvulsivants peut être important pour améliorer ces traitements. Ce projet participe à la compréhension du mécanisme thérapeutique des antidépresseurs et des anticonvulsivants sur la douleur neuropathique. Il sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Nous ne pouvons remplacer l'animal car il est nécessaire d'évaluer les effets thérapeutiques des différentes molécules testées, ainsi que leurs éventuels effets indésirables (pharmacologie *in vivo*), prévisibles ou pas, sur l'animal vigile. En effet, les expériences seront réalisées en minimisant autant qu'il en est possible de nombre d'animaux par condition expérimentale. Elles seront réalisées dans l'optique d'obtenir le maximum d'informations scientifiques par test, pour cette raison en fin d'expérimentation, les tissus seront prélevés sur les animaux sacrifiés pour analyser les changements moléculaires. Pour pouvoir raffiner les protocoles, les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout comportement d'inconfort. Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique inter-individuelle, les groupes expérimentaux, explorant les actions des traitements sur la douleur neuropathique, seront constitués de 6 à 10 souris. Ce projet comporte 13 procédures expérimentales, mais certaines d'entre elles font partie d'un enchaînement et utilisent les mêmes animaux ce qui limite considérablement leur nombre. Le nombre d'animaux prévus est de 3854 souris pour 5 années.

13296 Dans le cadre de la recherche des causes liées aux pathologies mentales, telles que les démences séniles, la maladie d'Alzheimer ou la Paraplégie surpanucléaire progressive, l'une des hypothèses actuelles de l'étiologie de ces maladies serait la mauvaise formation d'une protéine dans le cerveau, appelée protéine tau.

Plusieurs études ont en effet montré un lien entre les troubles cognitifs et cette altération de la protéine.

Dans notre projet, nous cherchons à mettre en évidence de potentiels effets bénéfiques de composés à but thérapeutiques en utilisant le modèle Souris.

Nous disposons pour cela d'une lignée murine génétiquement modifiée, porteuse d'une mutation qui entraîne une accumulation de la protéine tau anormale. Cette lignée a déjà montré de nombreux troubles cognitifs notamment de mémorisation à court et à moyen terme. Ces troubles apparaissent à l'âge de 6 mois.

Nous souhaitons donc administrer un composé candidat, développé au préalable dans des modèles *in vitro* et ayant fait preuve d'une innocuité totale sur des animaux contrôles.

En traitant des animaux génétiquement modifiés pour cette protéine avec ce composé et en comparant les performances mnésiques face à des animaux ne recevant pas de traitement et à des animaux non modifiés, nous chercherons à déterminer si les troubles cognitifs sont réduits par le composé.

Nous prévoyons 5 groupes de 12 animaux afin de tester trois doses de composé et de disposer des groupes contrôles adéquats.

REDUCTION : Les tests comportementaux utilisés dans ce projet sont employés en routine dans notre institut et nous avons pu déterminer que 12 animaux par groupe représentent l'effectif optimal pour pouvoir obtenir une puissance d'analyse statistiques suffisante, tout en réduisant autant qu'il est possible le nombre d'animaux employés. Les taches d'apprentissage chez le Rongeur sont en effet des analyses très subtiles et la variabilité entre les individus ne permet pas d'utiliser moins d'animaux.

REMPACEMENT : Le composé testé a franchi avec succès toutes les étapes *in vitro* et nous devons désormais aborder l'étude de ses effets sur des taches complexes, cible thérapeutique de cette molécule. Il n'est pas possible de se soustraire à l'utilisation de modèles animaux pour cela, seule étape permettant de travailler sur des troubles cognitifs complexes, telle que la mémoire à court ou moyen terme.

RAFFINEMENT : La principale procédure expérimentale de ce projet consiste en l'administration quotidienne du composé par injection. Ces injections répétées de faible volume sont couramment pratiquées et ne présentent aucun risque pour l'animal. Les taches comportementales permettant d'établir les performances mnésiques ne constituent pas des procédures expérimentales, étant donné leur innocuité. Néanmoins, les animaux recevront tous les soins liés à leur hébergement, avec un accès à l'eau et à la nourriture, un enrichissement du milieu et une surveillance quotidienne de leur état de santé.

Un total de 60 animaux expérimentaux est donc prévu dans cette demande, correspondant aux 5 groupes de 12 animaux.

13297 D'après l'organisation mondiale de la santé, l'arthrose est une des dix maladies les plus invalidantes dans les pays développés. A l'échelle mondiale, 9. 6% des hommes et 18% des femmes âgés de 60 ans en souffrent. Dans les prochaines décennies, le vieillissement de la population, couplé à des facteurs de risques tels que l'obésité, laisse suggérer que le nombre de personnes atteintes d'arthrose va continuer d'augmenter. Cette pathologie, d'étiologie plurifactorielle, est caractérisée par la présence de lésions du cartilage associée à des anomalies pathologiques diverses au niveau des articulations.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement médicamenteux permettant de régénérer le cartilage, les produits sur le marché ne permettant que de soulager et retarder l'avancé de la maladie avant une éventuelle chirurgie (prothèse). Ainsi, l'étude de produit innovant permettant la régénération du cartilage lésé est donc un enjeu majeur.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de produits injectés dans un organisme entier vivant. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la zone d'injection, les tissus environnants, l'activité de l'animal...

Les produits à tester seront donc utilisés chez des lapins sur lesquels aura été réalisée une lésion cartilagineuse en regard du plateau tibial de l'un des deux genoux. Le lapin est l'espèce couramment utilisée pour modéliser une arthrose du genou. Le remplacement de ce modèle par une méthode alternative n'est pas possible.

En effet, l'anatomie du genou du lapin est proche de celle de l'homme et sa taille facilite les analyses histologiques et d'imagerie par rapport à des plus petites espèces. De plus, il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Le recours à l'imagerie in-vivo et notamment le microscanner à rayons X permet de visualiser de manière non invasif l'évolution de la lésion cartilagineuse et donc de déterminer in-vivo l'évolution de la plaie cartilagineuse et l'efficacité des traitements. Ceci a pour conséquence une diminution

importante du nombre d'animaux utilisés. Une analgésie pré, per et post opératoire sera également mise en place.

Un nombre minimal de 8 animaux par groupe sera utilisé afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques. Environ 200 lapins seront utilisés par an (correspondant à 5 études de 40 lapins par an), soit un total de 1000 lapins maximum en 5 ans.

Des critères d'interruption ou « points limites » sont définis permettant d'interrompre l'étude pour des animaux présentant un état dégradé et/ou une douleur intense, et résistante aux traitements. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi de mettre en place les traitements adaptés le plus rapidement possible.

Pour respecter les besoins physiologiques/comportementaux et le stress des animaux, les lapins seront hébergés de manière collective, en maintenant des conditions environnementales adaptées à leur espèce (température, hygrométrie, éclairage, etc).

Les gestes techniques tels que la chirurgie, les injections de produits (voie intra articulaire), les séances d'imageries et les euthanasies seront effectués sous anesthésie afin d'éviter toute souffrance et stress de l'animal.

Après la chirurgie, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien-être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés (antibiotiques pour empêcher une infection de la zone opérée, antalgique pour supprimer la douleur liée à la chirurgie).

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de différentes molécules sur le développement de l'arthrose pour à terme, proposer de nouveaux traitements.

13298 Ce projet s'inscrit dans un contexte de recherche préclinique sur les traitements de la douleur neuropathique. Celle-ci est par définition consécutive à une lésion ou une pathologie du système nerveux. Elle affecterait, en France, environ 6% de la population. Certains antidépresseurs et anticonvulsivants représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles. Cependant, ils ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux et peuvent être invalidants. De plus, le mécanisme d'action de ces deux classes pharmacologiques dans le soulagement de la douleur neuropathique est, pour l'heure, encore mal connu. Néanmoins, des résultats récents suggèrent que des mécanismes neuroinflammatoires sont associés aux douleurs neuropathiques et que des traitements par antidépresseurs ou anticonvulsivants peuvent indirectement toucher ces mécanismes. De plus, ils s'accompagnent parfois d'une surexpression de certaines protéines transmembranaires impliquées dans la communication intercellulaire via la formation de jonctions communicantes notamment. Dans ce projet, l'objectif est d'associer un antidépresseur avec une molécule inhibitrice des protéines transmembranaires en question. L'ajout de cette deuxième molécule permettrait d'amplifier la réponse à l'antidépresseur déjà utilisé dans la pharmacopée comme traitement des douleurs neuropathiques. En outre, cela permettrait d'améliorer l'effet de ce traitement de référence, tout en diminuant la dose efficace de ce dernier. L'objectif de ce projet est donc de comprendre le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) à l'action thérapeutique de cette combinaison afin de déterminer de nouvelles voies de traitement, et ainsi d'évaluer les composantes pharmacologiques impliquées dans l'amélioration des symptômes. Ce projet sera réalisé sur des souris et sera conduit en respectant la règle des 3R. Remplacer : nous ne pouvons pas avoir recours à des méthodes alternatives pour réaliser un tel projet. Il est nécessaire d'évaluer les effets thérapeutiques des différentes molécules testées, ainsi que leurs éventuels effets indésirables (pharmacologie *in vivo*), prévisibles ou pas, sur l'animal vigile. En effet, les effets thérapeutiques des divers traitements sont évalués à l'aide de tests comportementaux impliquant une réponse motrice et mais également intégrée de l'animal. Il nous est donc impossible pour cette étape de travailler sur un modèle autre que l'animal. Réduire : nous réduirons chaque fois que possible le nombre d'animaux pour optimiser les procédures (étude longitudinale dans laquelle chaque animal est son propre contrôle). Elles seront réalisées dans l'optique d'obtenir le

maximum d'informations scientifiques par test, pour cette raison en fin d'expérimentation, les tissus seront prélevés sur les animaux sacrifiés pour analyser les changements moléculaires. Raffiner : pour pouvoir raffiner les protocoles, les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout comportement d'inconfort. Les animaux seront hébergés en cage collective avec nid et bâtons à ronger. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie générale. Pendant toute la durée de la chirurgie la température corporelle de l'animal est maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. Un suivi post-opératoire de l'état clinique des animaux est réalisé tout au long des procédures. Des points limites préalablement établis permettront de déterminer la nécessité ou non d'interrompre les procédures pour limiter la souffrance induite aux animaux. Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique inter-individuelle, les groupes expérimentaux permettant d'explorer les actions des traitements sur la douleur neuropathique seront constitués de 6 à 10 animaux par groupe (selon les tests statistiques réalisés dans l'équipe, notamment ANOVA multifactorielle). Le nombre d'animaux prévu est de 1562 souris pour 5 ans.

13299 L'immunothérapie a modifié de façon considérable la prise en charge de plusieurs types de cancers. Cependant il existe des limites à ces traitements ; les 2 principales étant un taux de réponse souvent inférieur à 25-30% en monothérapie et des complications auto-immunes dont la fréquence augmente significativement en cas de combinaison d'immunothérapies (diarrhées, éruption cutanée, anomalie hépatique, troubles psychiques, fatigue)

L'administration loco-régionale d'agents immunomodulateurs a déjà montré son intérêt par rapport à un traitement par voie générale aussi bien lors d'études précliniques que d'essais cliniques précoces. Elle permet de réduire les effets secondaires, d'augmenter les taux de réponse grâce à une meilleure pénétration des anticorps au sein de la tumeur et de son microenvironnement. Cela représente également un intérêt économique puisque la dose administrée est environ 10 fois inférieure à celle injectée par voie générale.

D'autre part, afin d'optimiser l'administration intratumorale, une libération prolongée de l'agent actif pourrait présenter comme intérêt la nécessité d'une seule injection au lieu de quatre actuellement nécessaires, et une exposition continue de la tumeur à l'immunothérapie. Pour arriver à cela, des émulsions stabilisées avec des nanoparticules protégeant l'immunothérapie ont été mises au point.

Le premier objectif de ce projet est de définir le schéma d'administration optimal maximisant l'efficacité de l'immunothérapie.

Enfin, chez l'homme, une efficacité à distance a pu être mise en évidence lors d'une administration locale du traitement. Un autre versant de ce projet a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'anticorps d'intérêt et d'étudier plus précisément cet effet à distance observé en clinique.

La réponse à l'immunothérapie nécessite différents acteurs du système immunitaire. La complexité des interactions cellulaires observées n'est pas modélisable *in vitro* ou *in silico*. Le traitement par immunothérapie implique une interaction forte entre cellules tumorales et cellules immunitaires. Actuellement, il n'est pas possible de traduire complètement la réponse aux immunomodulateurs *in vitro*. Nous ne pouvons donc pas répondre à la problématique posée sans l'utilisation d'animaux.

L'expérimentation sera divisée en étapes clefs, afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaire en cas de non validation de l'étape précédente (go/no-go).

Ainsi, si la réponse thérapeutique au traitement locorégional n'est pas satisfaisante, la forme vectorisée protégée ne sera pas testée. Cependant, afin de démontrer le bénéfice thérapeutique du traitement uniquement local par rapport aux conditions standards d'administration (non vectorisée, voie générale, plusieurs administrations), ces 2 voies d'administration seront évaluées. Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Les techniques de greffe sous-cutanées ont été standardisées pour améliorer la reproductibilité des résultats.

Ainsi, ce projet nécessitera un nombre de 421 souris.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués.

L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien.

13300 Le but de ce TP est de mettre en évidence le rôle joué par l'hypophyse via l'hormone gonadotrope LH, sur la sécrétion de testostérone par le testicule adulte chez le rat et également d'illustrer le phénomène de désensibilisation. En effet le testicule assure une double fonction, d'une part il produit des hormones stéroïdes c'est la stéroïdogénèse et d'autre part il produit les cellules sexuelles matures, les spermatozoïdes, c'est la spermatogénèse. Ces deux fonctions sont contrôlées en grande partie par l'hypophyse par l'intermédiaire des hormones gonadotropes. Au cours de ce TP nous nous intéressons uniquement à la fonction de production des hormones sexuelles mâles (la principale étant la testostérone) et à sa régulation par la LH (Luteinizing Hormone). De plus, nous mettons en évidence un phénomène classiquement observé en endocrinologie : la désensibilisation. Ainsi pour de nombreuses hormones polypeptidiques, après une forte stimulation hormonale, l'organe cible devient incapable de répondre à une deuxième stimulation. Pour répondre à cet objectif, les étudiants suivront la concentration plasmatique de testostérone au cours du temps.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 320 rats sur une durée de 5 ans. L'étude de la désensibilisation ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles *in vitro*. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre différents groupes. Toutes les précautions possibles (utilisation d'anesthésie, d'antalgique, habituation, ...) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort et la souffrance des animaux.

Grâce à ce TP, les étudiants pourront apprécier l'effet stimulateur de la LH sur la production de testostérone et mettront en évidence la notion de régulation endocrine (régulation hormonale via la circulation sanguine). Ils verront que cette réponse est rapide (quelques minutes). Pour le lot d'animaux désensibilisés, ils constateront que le testicule n'est plus capable de répondre à une deuxième stimulation ce qui illustre l'effet inhibiteur d'un stimulant sur sa propre cellule cible.

Ce TP est également l'occasion pour ces étudiants en L3, engagés dans un cursus où la physiologie animale tient une part importante, de réaliser des expérimentations sur un animal vivant avec d'excellentes conditions d'encadrement.

13301 Au cours du cursus des études pharmaceutiques, les étudiants doivent acquérir des connaissances approfondies concernant le mode d'action des médicaments et leurs effets pharmacologiques. Les enseignements de Pharmacologie y pourvoient sous forme d'enseignements théoriques et de travaux pratiques. Ces derniers ont lieu lors de la quatrième année du cursus, en vue de l'obtention du diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Ils ont pour but de confronter les étudiants à des expériences types de pharmacologie dont certaines sont réalisées *in vivo*. Le Pharmacien ainsi formé doit pouvoir intégrer un laboratoire de recherche, comprendre et analyser de manière critique les résultats d'études de pharmacologie expérimentale (articles scientifiques...) et répondre au questionnement du public relativement à l'expérimentation animale ou aux médicaments responsables d'effets indésirables.

- Au début de la première séance de TP, les étudiants sont sensibilisés à l'éthique et à l'expérimentation animale. La règle des « 3R » leur est expliquée. L'étudiant est informé que le premier devoir du chercheur est de respecter l'animal expérimenté et que la pratique de l'expérimentation animale est encadrée par diverses dispositions légales relatives à l'autorisation des projets, à la formation des personnels et expérimentateurs, à la provenance des animaux, aux

conditions de transport et d'hébergement. Les animaleries par exemple doivent être agréées, les fournisseurs déclarés...

- Cette première séance (1^{ère} procédure) se poursuit par une familiarisation aux rongeurs (préhension, pesée de l'animal et injection de substance) chez la Souris de souche Swiss CD1. Les étudiants mettent en œuvre, à cette occasion, une expérience de « tout ou rien » en étudiant l'effet de doses croissantes d'un anesthésique sur l'endormissement de la Souris ; cette expérience se substitue à la détermination de la dose létale 50 et apparaît éthiquement plus recevable pour les étudiants. 2 enseignants (pour 18 étudiants max) encadrent cette séance.

- D'autres séances relatives à la psychopharmacologie prévoient de confronter les étudiants à la réalisation de différentes épreuves comportementales couramment utilisées pour mettre en évidence des effets anxiolytiques, antidépresseurs ou antipsychotiques, en testant des substances pharmacologiques de référence. Ces séances correspondent aux procédures 2 à 4 proposés ci-après.

- Actuellement, le *numerus clausus* au concours de Pharmacie s'élève à 85 étudiants par promotion, répartis en 5 groupes. Au sein de chaque groupe, les étudiants sont divisés en sous-groupes de façon à fonctionner sur un mode « séances tournantes ». Lors de chaque séance, chaque sous-groupe de 3-4 étudiants réalise une expérience choisie parmi les différents protocoles (n° 2 à 4). Les épreuves proposées, réalisées chez la Souris, sont jugées de gravité légère ou modérée, selon l'annexe de l'arrêté du 1/2/13 régissant l'évaluation de projet et ne sont pas remplaçables par des méthodes alternatives. De ce fait, dans le but de diminuer le nombre total d'animaux utilisés, ces souris peuvent être réutilisées, après une période de récupération, pour une autre épreuve du présent projet. Cela conduit à utiliser au maximum 500 souris par an, soit 2500 souris sur les 5 ans. Certains étudiants apparaissent plus réticents que d'autres à l'expérimentation chez l'animal, généralement pour des raisons d'appréhension ou éventuellement pour des raisons médicales. Dans ce contexte, les étudiants ne sont jamais obligés de procéder eux-mêmes aux injections ou à la manipulation des animaux. Des solutions pédagogiques sont toujours trouvées. Par exemple, les étudiants les plus à l'aise sont répartis au sein des différents sous-groupes, permettant aux autres, selon les cas, soit de prendre en charge le test sans réaliser les injections, soit de participer aux seules mesures (chronométrages) ou observations faites lors des épreuves, sans manipuler eux-mêmes l'animal. En cas de difficulté particulière, l'enseignant n'hésite pas à procéder lui-même à l'administration de l'agent pharmacologique. Ces dispositions visent à réduire le stress tant des étudiants que des animaux (raffinement).

13302 Tous nos mouvements volontaires nécessitent le bon fonctionnement des muscles striés squelettiques, composés eux même de milliers de fibres musculaires. Ces cellules géantes sont issues de la fusion de cellules spécialisées (myoblastes) et sont par conséquent multinucléés. Les noyaux qui composent les fibres musculaires se localisent à leur périphérie et sont espacés de façon régulière tout le long de la fibre. Cette organisation structurée est importante et nécessaire pour le bon fonctionnement de la fibre musculaire. Une localisation perturbée des noyaux est retrouvée dans certaines maladies musculaires (myopathies), telles que les myopathies centronucléaires ou la sarcopénie, et apparaît comme une composante importante du dysfonctionnement musculaire. Dans ce contexte, rétablir une organisation nucléaire correcte permettrait alors d'améliorer la fonctionnalité des fibres et donc le fonctionnement des muscles. Ce projet a ainsi pour but de participer à l'amélioration des connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du positionnement nucléaire dans les fibres musculaires et donc leur implication dans la fonctionnalité des muscles. In fine, ces connaissances permettront de mieux comprendre la physiopathologie des myopathies présentant une anomalie de positionnement des noyaux et donc leur prise en charge thérapeutique.

Au cours des trois années du projet, un maximum de 240 souris de la lignée C57BL/6 de 8 semaines seront utilisées dans une procédure d'électrotransfert de plasmides dans le muscle tibial antérieur de souris adulte. L'expérimentation sera réalisée sur un lot de 120 souris, répétée éventuellement une fois selon les résultats obtenus au préalable.

Le recours aux modèles *in vitro* existants, notamment à la culture de lignées cellulaires ainsi que la culture de cellules musculaires primaires, ne permettent pas d'obtenir une maturation finale des fibres. En effet, l'environnement cellulaire dans lequel se développe les fibres musculaires dans les modèles *in vitro* diffère de l'environnement physiologique *in vivo*. Par exemple, l'attachement des fibres musculaires aux tendons via les jonctions myotendineuses ou encore la stimulation par les motoneurones à la jonction neuromusculaires sont absents en modèles *in vitro*. A ce stade, l'emploi du modèle animal est justifié car il est le seul à présenter un système musculaire complet (fibre musculaire, cellules souches, ancrage tendineux, matrice extracellulaire etc). Après des études pilotes sur le modèle animal, la procédure a été optimisée et nous permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement représentatifs.

Des méthodes de raffinement ont été choisies. Un antidouleur sera administré avant l'anesthésie générale de l'animal. Cela permettra de limiter toute douleur qui pourrait survenir au réveil de l'animal. La procédure sera réalisée sous anesthésie générale de l'animal de façon à réduire son stress. Post-intervention, les souris seront observées 3x/semaine. Nous apprécierons différents éléments (apparence, comportements sociaux, posture...) qui nous permettront d'évaluer l'état de bien-être des souris. Nous avons défini des points limites tels que des signes d'automutilation, vocalisation, comportements sociaux anormaux.

13303 Ce protocole s'insère dans un projet plus global ayant pour but d'objectiver le bien-être (BE) et la santé des caprins en élevage par la construction d'un protocole consensuel (utilisant des indicateurs fiables) pour l'évaluer dans la diversité des systèmes d'élevage français. Ces outils d'objectivation du BE permettront aussi aux chercheurs et techniciens d'élevage de travailler sur des pratiques visant à améliorer le BE et intégrant les spécificités et les contraintes des systèmes de production.

L'un des volets de ce projet consiste en la définition et la validation d'un set complet d'indicateurs du BE et de la santé des chèvres à différents stades de production, chez le jeune et l'adulte, élevés exclusivement en bâtiment ou ayant des périodes d'accès à l'extérieur (pâturage, aire d'exercice). Par validation, on entend la vérification que les indicateurs testés donnent des informations cohérentes ou complémentaires entre eux. Cette validation nécessite de comparer les résultats obtenus en utilisant des indicateurs comportementaux à ceux obtenus avec des indicateurs physiologiques (réponse neuroendocrinienne de stress, impact sur la réponse inflammatoire et le stress oxydant). Or cela n'a pas encore été fait dans l'espèce caprine.

Ainsi, le présent projet a pour objectif de comparer les niveaux d'expression d'indicateurs physiologiques, déjà utilisés sur l'espèce caprine comme mentionné dans la littérature et classiquement utilisés dans d'autres espèces pour évaluer le stress ou le bien-être (notamment dans l'espèce porcine), et de vérifier que les indicateurs non invasifs et comportementaux corréleront correctement avec ces indicateurs physiologiques. In fine, seuls les indicateurs non invasifs validés dans le projet seront ensuite diffusés sur le terrain pour mesurer le bien-être et la santé des chèvres dans les élevages laitiers.

Le présent protocole tirera partie des événements stressants survenant « naturellement » au cours de la vie des chèvres de notre élevage. Nous étudierons deux stades de production (chevrettes au moment du sevrage, environ 2 mois d'âge, et chevrettes primipares en fin de lactation, avant leur 2ème mise à la reproduction donc environ 18 mois d'âge). Les indicateurs de stress seront mesurés juste avant puis pendant deux périodes où la conduite d'élevage habituelle des animaux génère un stress : 1) le mélange des chèvres primipares et multipares à la fin de la 1ère lactation des primipares (août 2019), et 2) le transfert des chevrettes de la nurserie à la chèvrerie à la fin de la période de sevrage (avril 2020). Chaque période d'étude durera 10 jours. Le protocole sera réalisé sur 35 animaux par période et en une seule répétition (70 animaux au total).

Les indicateurs physiologiques choisis sont descriptifs de la réponse de stress (cortisol sanguin et salivaire), de l'activation immunitaire (numération sanguine), de l'état inflammatoire (haptoglobine) et du statut oxydant (hydroperoxydes sanguins et capacité totale antioxydante du plasma). Ils seront mesurés juste avant puis 24h et une semaine après l'événement stressant, sur 35 animaux. Des prélèvements de salive seront réalisés les mêmes jours sur un sous-effectif de 20 animaux, en laissant les chèvres mâcher volontairement des cylindres de coton qui leur seront présentés

individuellement par les expérimentateurs. Les mesures comportementales consisteront en des observations de visu réalisées en décalé (des jours différents) par rapport aux prélèvements, afin que ceux-ci ne biaisent pas les observations comportementales.

Nous suivrons la règle des 3 R. Remplacer : Il est nécessaire de conduire cet essai sur animaux, aucun modèle ne peut le remplacer. Réduire : nous nous sommes attachés à réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude en limitant le nombre de stades physiologiques étudiés : l'un précoce (sevrage) et l'autre à l'âge adulte (fin de 1ère lactation). N'ayant pas connaissance de la variabilité interindividuelle sur les variables considérées car il s'agit d'une première étude sur cette thématique dans notre unité, il est impossible de réaliser un calcul de puissance statistique pour déterminer un effectif minimal. L'objectif étant de corrélérer les réponses physiologiques et comportementales, et ces dernières étant réalisées à l'échelle du lot, nous avons choisi d' enrôler l'ensemble des animaux du lot pour les prélèvements également. Raffiner : les 70 animaux seront soumis à une conduite d'élevage et d'alimentation classique, respectueuse du bien-être et bénéficieront d'un suivi proche par les animaliers locaux et les différents intervenants. Tous les prélèvements seront réalisés par du personnel formé et expérimenté et selon les techniques standardisées. En cas de trouble de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence.

13304 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause mondiale de morbidité et mortalité résultant de complications coronariennes (angor et infarctus du myocarde) et carotidiennes (accidents vasculaires cérébraux (AVC) et ischémiques transitoires (AIT)). Ces patients présentent des signes cliniques faisant suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose vulnérable ou à un phénomène d'embolisation menant à l'occlusion d'artères. La rupture de ces plaques d'athérosclérose vulnérables provoque la formation d'un thrombus (caillot de sang) qui obstrue potentiellement la lumière du vaisseau, entraînant l'ischémie (diminution ou absence d'apport sanguin à un organe) myocardique et l'infarctus du myocarde ou bien l'embolisation à distance d'artères cérébrales menant à l'AIT ou l'AVC (qui représente la première cause de handicap chez l'adulte).

A l'heure actuelle, il n'existe aucune technique d'imagerie qui permet la détection des plaques d'athérosclérose vulnérables. L'enjeu clinique de notre projet repose sur la détection précoce des plaques vulnérables permettant la prévention de ces accidents ischémiques dans une population à risque cardiovasculaire. Les plaques d'athérosclérose sont le résultat d'un remaniement des artères par accumulation de lipoprotéines, sang et produits sanguins, dépôts calcaires et autres minéraux. Des précédentes études ont montré que certaines enzymes impliquées dans l'apoptose comme la PARP1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1) étaient surexprimées au niveau de la plaque d'athérosclérose. L'objectif de notre projet est d'évaluer un ligand de PARP1 marqué au Fluor 18, comme nouveau radiotraceur des plaques d'athéromes en imagerie TEP (Tomographie par Emissions de Positons).

Pour réaliser notre projet nous utiliserons un modèle d'athérosclérose murin avec des souris transgéniques dépourvues du gène de l'Apolipoprotéine E, appelées KO ApoE. Celles-ci développent des plaques d'athérome naturellement en vieillissant. Ce modèle est connu de notre équipe de recherche qui travaille dessus depuis plus de 3 ans. Nous utiliserons des souris non transgéniques et avec le même fond génétique pour nos contrôles : les C57/BL6. Un total de 8 souris sera utilisé âgées de 15 à 25 mois.

Dans un souci de respect des 3R :

Remplacement : Il n'existe pas de modèle cellulaire d'athérosclérose. Nous avons besoin d'utiliser des organismes vivants entiers pour répondre à notre problématique, avec toutes leurs complexités physiologiques cardio-vasculaires. Il est aussi important de savoir si notre molécule cible bien les zones d'intérêts dans l'organisme.

Raffiner : la procédure d'imagerie n'induit pas de douleur, les souris seront anesthésiées tout au long des acquisitions et placée sur plateau chauffant afin de garder la souris immobile dans un état

d'inconscience de qualité. Durant les acquisitions, les souris seront régulièrement observées (fréquence respiratoire).

Réduire : La technique d'imagerie est une technique de réduction qui permet d'observer la progression de la molécule au cours du temps sans devoir mettre à mort l'animal. De plus, dans cette expérimentation, nous revalorisons des souris issues de l'élevage qui n'avaient pas pu être intégrées dans les projets précédents.

Les produits injectés seront testés *in vitro* pour s'assurer de leur innocuité.

13305 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie progressive qui se définit par une élévation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, évoluant vers une défaillance cardiaque droite puis au décès du patient. Outre la transplantation pulmonaire, dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. L'HTAP se manifeste par des signes apparemment bénins, comme l'essoufflement à l'effort, mais responsables d'un diagnostic tardif et d'un pronostic grave : en l'absence de traitement, l'espérance de vie n'atteint en moyenne que 2,8 ans après diagnostic. Bien que les mécanismes physiopathologiques restent encore à découvrir, il est connu que des anomalies touchant les fonctions des cellules endothéliales des petits vaisseaux pulmonaires vont être responsables de la réduction progressive de la lumière vasculaire, empêchant ainsi le bon écoulement sanguin et favorisant le développement et la progression de la maladie. Afin d'identifier et de mieux comprendre ces anomalies qui touchent les cellules endothéliales pulmonaires dans l'HTAP, nous souhaitons étudier le rôle de la dérégulation de l'activation des récepteurs aux minéralocorticoïdes (mineralocorticoid receptors ou MR) dans la mise en place de la maladie et de déterminer si l'activation du MR pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique.

En effet, nos données d'études *in vitro* montrent un défaut d'activation des MR dans les cellules provenant de patients atteints d'HTAP. Cette maladie est complexe et fait intervenir plusieurs types cellulaires : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, péricytes et cellules immunitaires. Bien que notre laboratoire travaille sur des cultures de ces types cellulaires provenant de patients atteints de cette maladie, seule l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble de ces acteurs au sein d'un même modèle, dans un environnement physiologique et pathologique. Les modèles animaux d'HTAP sont alors des outils très importants et permettent le suivi de la mise en place dans le temps des différents mécanismes physiopathologiques et d'avoir donc accès aux phases précoces de la maladie. Les modèles animaux, régulièrement utilisés dans de nombreuses publications de différentes équipes de recherche, sont un réel apport et un outil indispensable pour nos travaux de recherche. Le modèle n'est d'ailleurs pas remplaçable par une méthode alternative dans ce cas précis.

Nous souhaitons évaluer le rôle de la dysfonction endothéliale et la contribution des MR dans le modèle SUGEN HYPOXIE, puis traiter l'HTAP induite à l'aide d'un inhibiteur spécifique des MR. Ce modèle fait intervenir des modifications fonctionnelles, structurales et moléculaires du lit vasculaire pulmonaire et du ventricule droit. Les contraintes observées chez l'animal ne seront pas plus sévères que les signes bénins retrouvés chez l'homme puisque l'étude se réalise dans les phases précoces de l'HTAP. Nous évaluerons plusieurs doses médicamenteuses seules et combinées avec les traitements palliatifs utilisés chez le patient. Nous visons à réduire au minimum le nombre de rats utilisés afin d'obtenir des données statistiquement exploitables en tenant compte de la dispersion des résultats. Durant les expérimentations, les animaux seront quotidiennement observés et évalués au moyen d'un score (apparence, poids et comportement) pour s'assurer de leur bien-être. Nous envisageons donc pour cette étude d'utiliser 156 rats Sprague Dawley sur une durée de 5 ans.

13306 Jusqu'à 20 % des femmes enceintes sont confrontées durant leur grossesse à de troubles de l'humeur telle que la dépression. Les traitements les plus populaires contre la dépression maternelle sont les antidépresseurs de la famille des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et 5-10 % des femmes enceintes sont traitées par ces médicaments. Des recherches récentes démontrent que le traitement par ISRS pendant la grossesse peut modifier de manière

significative le comportement chez les nouveaux nés et les enfants, sans malheureusement avoir un effet thérapeutique chez les mères. Par ailleurs, il reste de nombreuses questions quant aux implications à long terme d'une exposition indirecte à ces antidépresseurs durant la grossesse et l'allaitement pour le développement des enfants.

L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet de l'exposition périnatale aux ISRS sur les paramètres neurobiologiques de la mère et de sa progéniture, en utilisant un modèle de stress et de dépression maternelle chez le rat. De nombreuses études ont montré que l'exposition périnatale aux ISRS peut contrecarrer le développement normal des comportements sociaux chez les enfants : des enfants de 4 ans qui ont précédemment été exposés de manière prénatale aux ISRS montrent plus de comportements d'externalisation (agression, attention et hyperactivité, et comportement de défiance) ainsi qu'une augmentation des comportements d'internalisation (dépression, anxiété, ...). De plus, des études épidémiologiques suggèrent très fortement que l'exposition périnatale aux ISRS augmente la probabilité de développer des traits autistiques. Chez les modèles animaux, le traitement postnatal aux ISRS diminue le comportement de jeux chez les juvéniles et affecte les comportements de reproductions. La trajectoire développementale de ces effets et les cibles physiologiques des différents types de médication restent cependant à déterminer. Le but de notre projet est de déterminer comment l'exposition périnatale à deux ISRS les plus couramment utilisés, fluoxétine (Prozac) et sertraline (Zoloft), sont capables d'affecter de façon spécifique le développement des interactions sociales, y compris les comportements de reproduction, et les paramètres neurobiologiques sous-jacents chez la descendance mâle et femelle rat, en utilisant un modèle de stress maternel et de dépression. Cette étude dépend de processus très clairement liés à la présence du placenta et des interactions complexes entre le fœtus et la mère, raison pour laquelle des études *in vivo* à l'échelle de l'organisme entier sont inévitables (Remplacement) Les expériences principales seront réalisées sur des rates gestantes et sur leur descendance. Les mères gestantes seront réparties en 4 groupes 1. Control (pas de stress, pas de ISRS), 2. Stress (pas de ISRS), 3. Stress+Fluoxétine, 4. Stress+Sertraline. Une dose de 15mg/kg/jour sera administrée aux mères gestantes, sur base des doses administrées chez les femmes durant leur gestation. Le traitement sera administré via un biscuit vanillé contenant l'ISRS ou son solvant durant la gestation et durant la l'allaitement, jusqu'au moment du sevrage. Ce type de traitement mime la situation clinique chez les humains (traitement oral) et surtout élimine le stress potentiel de l'administration chez la mère (Raffinement). Ces doses utilisées pour les ISRS ne sont pas toxiques et ne provoquent pas de malformation chez les nouveau-nés. Dans le cas très improbable de souffrance d'un individu au cours de la procédure expérimentale, les mesures appropriées de réduction de la douleur seront employées. Le nombre d'animaux totaux utilisés dans cette expérience est limité et est le nombre minimum qui devrait nous permettre, s'il y a des effets, d'obtenir des différences statistiquement significatives et scientifiquement utilisables (Réduction). Nous étudierons les interactions sociales chez les juvéniles et les adultes. Nous nous attacherons également à définir les mécanismes neurobiologiques associés aux changements de comportements. Ses études seront réalisées chez la descendance mâle et femelle, car des travaux précédents ont démontré des effets différentiels des ISRS sur les 2 sexes. Cette étude utilisera un total de 768 rats (comprenant les mères, la descendance et les stimulus sociaux) sur une durée de 5 années. Cette étude devrait nous permettre d'améliorer nos connaissances sur les risques et bénéfices de l'utilisation de la fluoxétine et sertraline dans le traitement de la dépression maternelle durant la période périnatale.

13307 Le foie est un organe unique chez les mammifères qui possède une capacité à se régénérer remarquable. Après l'ablation des deux tiers (2/3) du foie, celui-ci se regenère pour retrouver sa masse initiale. Cette ablation est le modèle le plus utilisé pour étudier la régénération du foie.

Dans ce projet, nous voulons voir si les voies de régulation impliquées dans la régénération du foie sont liées à la sénescence. La sénescence est le processus de vieillissement biologique. Plus particulièrement, nous allons voir à quel moment après l'ablation des deux tiers du foie, les cellules sénescents apparaissent. Cette étude sera aussi faite dans des souris où il n'y a pas de sénescence afin de voir si la régénération du foie sera tout aussi efficace.

L'objectif de ce projet est d'étudier si le processus de sénescence a des effets bénéfiques ou néfastes sur le processus de régénération du foie. La réalisation de ce projet fera avancer notre compréhension de la régénération des tissus et pourrait mener au développement de médicaments qui améliorent le processus de régénération dans de nombreux tissus.

Nous aurons besoin de 1560 animaux au total, respectant les règles 3R :

i) Réduction : Comme il s'agit d'un protocole bien établi, cela nous permettra de minimiser le nombre de souris utilisées.

ii) Raffinement : Toutes les interventions sont réalisées sous anesthésie générale. Un traitement antidouleur est prévu pour limiter les souffrances en pré- et post-opératoire.

iii) Remplacement : Comme ce projet étudie la régénération du foie et les gènes qui sont associés, la souris est le seul modèle où cette étude est possible. En effet, la souris est un mammifère capable de régénérer son foie à la suite d'une hépatectomie partielle. En outre, notre projet consiste à étudier le rôle de la sénescence dans la régénération du foie au niveau moléculaire, et nécessite l'utilisation de souris génétiquement modifiées, déficientes en gènes clés régulant la voie de sénescence. De telles ressources génétiques ne sont pas disponibles dans d'autres modèles animaux.

13308 Les populations de sangliers ont fortement augmenté ces 30 dernières années. Cette augmentation est associée à un accroissement des dégâts agricoles, à des collisions routières plus fréquentes et généralement à des conflits entre chasseurs, en charge de la régulation des effectifs et du paiement des dégâts agricoles, et les agriculteurs, les gestionnaires de réserve, ainsi que les autres usagers des espaces ruraux et périurbains. Un projet inter-disciplinaire sur cette problématique est actuellement développé sur 2 régions, l'une montagnaise rurale et l'autre de garrigues périurbaines.

L'un des objectifs du projet est de fournir des données objectives sur les déplacements des sangliers au sein des sites d'études, et sur les causes de ces déplacements. Cet objectif sera poursuivi en capturant, par cage-pièges appâtées, des sangliers, pour les équiper de collier GPS. Ce projet fait l'objet de la présente demande. L'étude concernera 30 animaux par région, soit 60 animaux au total. Ce nombre a été choisi pour être le plus faible possible tout en permettant d'obtenir des résultats robustes pour chaque sexe au vu de la fréquente variabilité des déplacements individuels chez cette espèce. Afin de réduire l'impact de l'étude sur les animaux, les cages, disposées sous couvert et armées le soir, sont suffisamment appâtées et visitées le plus rapidement possible le matin. Les animaux sont anesthésiés pour la manipulation (pose de collier GPS, bouclage auriculaire et prélèvement de tissu à l'oreille) dont le temps est limité au minimum (environ 15 min). Les colliers GPS utilisés ne représentent qu'au maximum 1.6 % du poids de l'animal, et sont équipés d'un système de relargage automatique après 60 semaines. Le bouclage auriculaire permet de ne pas manipuler les animaux plusieurs fois. De manière générale, le remplacement n'étant pas par ici possible, une attention particulière est portée à la réduction de l'impact de l'étude par la minimisation des effectifs utilisés, et par le raffinement de la procédure.

13309 Chaque année on évalue l'incidence des lésions médullaires de 9.2 à 246 cas par million d'habitants, touchant préférentiellement une population jeune de 15 à 30 ans.

Depuis plusieurs années, des études ont été menées afin de proposer un traitement en se basant sur deux axes thérapeutiques : la neuroprotection et la neurorégénération.

De récentes études tirant avantage de nouveaux modèles de souris transgéniques ont été menées et ont permis de mettre en évidence que dans la moelle chez l'adulte il existe un potentiel souche restreint aux cellules qui bordent le canal central ; les cellules épendymaires. Ainsi, la caractérisation et la réactivité de ces cellules souches endogènes lors d'une lésion médullaire a pu être mis en évidence ; ce qui a permis de proposer ces cellules comme une nouvelle piste thérapeutique prometteuse. Cependant, on ignore toujours comment moduler cette réactivité.

Nous émettons donc l'hypothèse que la réponse des cellules souches médullaires peut être modulée après lésion et serait différentielle en fonction du traitement utilisé. Nous nous proposons

de tester cette hypothèse par le biais d'un traitement non-invasif ; la stimulation magnétique répétitive.

La stimulation magnétique répétitive module la neurotransmission, la myélinisation, et a des effets neuroprotecteurs. De ce fait, cette méthode non invasive est utilisée dans le traitement de certaines pathologies neurologiques.

C'est pourquoi nous nous proposons de mesurer la réactivité des cellules épendymaires, cellules souches médullaires, après stimulations magnétiques répétitives Trans-médullaire (rTMS) dans un cadre lésionnel.

Pour cela, 80 souris seront utilisées : 60 souris transgéniques de 8 semaines issues de trois lignées différentes afin de réaliser des études histologiques ainsi que 20 souris C57BL/6 de 8 semaines qui serviront à réaliser des mesures de la récupération fonctionnelle. Un nombre minimum d'animaux sera donc inclus dans chaque groupe afin de permettre une étude statistique fiable. Les animaux ne peuvent être remplacés par une méthode alternative.

Les souris seront opérées sous anesthésie générale. Conformément au principe de l'éthique animal reposant sur la règle des 3R, le nombre d'animaux a été évalué à partir d'études proches de celles-ci précédemment effectuées dans notre laboratoire et dont les statistiques avaient été établies pour réduire au minimum le nombre d'animaux opérés. De même les conditions d'hébergement, de soins, d'antalgie et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire le plus possible toutes douleurs, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux de manière à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux conformément aux normes actuelles encadrant l'éthique animale. Ces derniers seront observés quotidiennement durant toute la durée du protocole expérimental. Nous mettrons en place des points limites basés sur différents critères objectifs (expressions faciales de la souris, perte de poids etc).

Tout signe de souffrance entraînera la mise à mort des animaux.

13310 La NAFLD (maladie non-alcoolique du foie gras) est une maladie nutritionnelle du foie considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Elle concerne 30% de la population générale faisant d'elle la pathologie hépatique la plus fréquente mondialement. La NAFLD récapitule différents stades de lésions hépatiques allant de l'accumulation de gras au sein du foie (la stéatose) à l'inflammation du foie (NASH ou stéatohépatite non-alcoolique). La NASH démultiplie le risque cardiovasculaire, augmente le risque de cirrhose et à terme le développement de cancer du foie. Si l'obésité et le diabète de type II sont des facteurs de risques majeurs dans le développement de la NASH, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur du microbiote intestinal (MI) comme facteur causal de la maladie expliquant les variabilités interindividuelles observées au sein de la population. En d'autres termes en fonction de la composition du microbiote intestinal, le risque de développer une NAFLD est différent. De plus, il est démontré que modifier le microbiote intestinal par des fibres/prébiotiques ou des probiotiques peut améliorer l'évolution des lésions du foie au cours de la NAFLD dans des modèles murins. Ainsi, la pectine, une fibre soluble présente dans l'alimentation, permet de modifier le microbiote intestinal et d'améliorer la progression des lésions hépatiques. L'épithélium intestinal a un rôle prépondérant dans les effets protecteurs de la pectine. En effet, on observe après traitement par la pectine un renforcement de la barrière intestinale caractérisé par une augmentation de la production de mucus et de peptides anti-microbiens. Cet effet semble dépendant du métabolisme du tryptophane, un composant des protéines qui interagit au niveau des cellules et des organes via un récepteur présent dans de nombreux organes, entre autre l'intestin.

Le but du projet de recherche est d'étudier le rôle protecteur et curatif de la pectine dans la NASH. Il nous faut pour cela, comprendre l'effet de l'alimentation puis de la pectine sur les bactéries intestinales, l'effet de ces bactéries sur la barrière intestinale et au final l'impact de cette atteinte sur le développement des lésions du foie

Nous projetons de prouver d'une part que l'effet de la pectine passe par les modifications du microbiote intestinal et d'autre part à identifier les mécanismes d'action par lesquels la pectine exerce son effet protecteur vis-à-vis des lésions hépatiques au cours de la NAFLD. Nous souhaitons

en particulier déterminer si cet effet passe bien par le métabolisme du tryptophane. Pour montrer que le microbiote intestinal modifié par la pectine suffit à induire ses effets, des transplantations fécales de ce microbiote modifié seront faites chez des souris soumises à régime hypercalorique (lipides et sucrose augmentés, cholestérol à 1%) puis ensuite traitées à la pectine ou non. Pour identifier les organes les plus impliqués dans la réalisation des effets de la pectine via le microbiote intestinal et le métabolisme du tryptophane, des souris déficientes en médiateurs de cette voie métabolique du tryptophane, dans différents organes seront utilisées.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). Le seul modèle auquel nous pouvons avoir recours pour étudier les interactions entre organes distants est l'animal (Remplacement). Le rongeur, ici la souris, partage bon nombre de processus cellulaires avec l'Homme et sera utilisé comme modèle. Par ailleurs, c'est chez la souris que nous possédons des modèles de souris transgéniques permettant d'étudier le métabolisme du tryptophane.

Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subies par les animaux, par un enrichissement en plastique approprié (Raffinement) qui exclut l'enrichissement de type carton ou papier, faits de cellulose. La cellulose est digérée par les bactéries intestinales et interfère avec le protocole dans la mesure où chaque animal en aura une consommation aléatoire. Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour l'animal en souffrance. Les souris non transgéniques seront étudiées une fois et serviront de contrôles pour toutes les lignées (Réduction). Le calcul de puissance des paramètres à étudier permet de calculer le nombre d'animaux nécessaires au projet. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 368 animaux.

13311 L'éradication des infections virales est un défi persistant dans le domaine médical, non seulement en raison du problème de la propagation mais aussi de la capacité du virus à évoluer par des mutations génétiques. Contrairement aux infections bactériennes, qui sont le plus souvent traitées avec des antibiotiques, le développement de traitements antiviraux est difficile et la vaccination contre les infections virales n'est pas toujours possible.

Ces considérations s'appliquent aux maladies respiratoires causées par des coronavirus humains (HCoV) qui généralement entraînent des symptômes bénins de type rhume chez l'Homme. Cependant en 2002 et 2012, deux coronavirus émergents, hébergés par des animaux et soudain transmis à l'homme, sont responsables de 2 épidémies, celle du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) et celle du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS pour Middle-East Respiratory Syndrome). L'infection entraîne une pneumonie aiguë rapidement évolutive pouvant aller jusqu'à la mort.

Initialement, l'infection au coronavirus MERS-CoV a été sporadique, touchant 2428 patients à travers 27 pays, avec une mortalité de 35%. Cependant, les risques de propagation chez l'homme, observée en particulier dans les milieux hospitaliers, a soulevé des préoccupations quant au potentiel pandémique du MERS-CoV. Il n'existe actuellement aucun vaccin ni traitement spécifique. Le développement d'un traitement constitue donc un enjeu de santé publique.

Plusieurs expériences ont montré que l'activité antivirale de molécules était augmentée lorsque celles-ci étaient fixées et concentrées à la surface de nanostructures. Les carbone-dots sont une nouvelle classe thérapeutique de nanomatériaux. L'intérêt de ces nanostructures réside dans le fait que, malgré leur petite taille, elles bénéficient d'une grande surface sur laquelle on peut greffer un grand nombre d'éléments. Facilement synthétisés, ces nanomatériaux à base de carbone suscitent l'intérêt de chercheurs dans de nombreux domaines, notamment biomédicaux (ex : bio-imagerie, délivrance de médicaments, théranostique...).

Des carbone-dots spécifiques ont été identifiés *in vitro* comme inhibant efficacement l'entrée virale dans des cellules. L'objectif de ce projet est donc de les administrer par voie pulmonaire et d'étudier leur profil pharmacocinétique et toxicologique, soit sous leur forme libre, soit sous une forme encapsulée pour réguler et prolonger leur libération dans le poumon.

En tant que nanomatériaux récemment découverts et développés, peu d'études pharmacocinétiques et toxicologiques ont été réalisées sur les carbone-dots. Ainsi, ces études aideront à mieux caractériser ces nouveaux nanomatériaux prometteurs pour leurs applications biomédicales futures. Elles nécessitent une étude sur l'animal car lors de la biodistribution pulmonaire, les échanges avec le compartiment sanguin et l'ensemble des éléments physiologiques pulmonaires peuvent impacter la pharmacocinétique et la toxicité des systèmes évalués.

Des souris recevront une administration pulmonaire des formulations (carbone-dots seuls ou encapsulés). Un marquage des carbone-dots avec une sonde fluorescente permettra un suivi pharmacocinétique par imagerie d'un même animal dans le temps, contribuant ainsi à réduire le nombre d'animaux utilisés. Une quantification *ex vivo* de la fluorescence dans les différents organes sera également effectuée à différents temps sur 48h. La toxicité pulmonaire des formulations sera évaluée par analyse de marqueurs inflammatoires 24h et 48h après administration. Les procédures se dérouleront sous anesthésie.

Les procédures expérimentales seront menées sur un nombre limité mais nécessaire d'animaux grâce à une planification statistique minutieuse et ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des animaux. Le nombre a été évalué à 391 souris. Le bien-être des animaux sera également pris en compte. Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

13312 La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative. Elle se déclare à l'âge adulte (40-80 ans) et évolue, en 3 à 5 ans, vers la paralysie complète et le décès du patient. Elle est causée par la mort des motoneurones (cellules contrôlant les mouvements du corps), entraînant un affaiblissement progressif et une atrophie des muscles. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. A ce jour, il n'existe pas de traitement contre la SLA car les mécanismes physiopathologiques sont méconnus. La SLA touche les deux sexes et son incidence augmente avec l'âge à partir de 40 ans. Elle peut dans certains cas être associée à des troubles cognitifs de type démence fronto-temporale (DFT). Dans une cohorte humaine de patients souffrant de la forme DFT-SLA, une mutation a été identifiée sur le gène d'une protéine mitochondriale. La mitochondrie est un petit organite indispensable dans les processus énergétiques cellulaires.

Pour comprendre comment la mutation du gène mitochondrial peut conduire à la mort des motoneurones, un modèle murin porteur de la mutation d'intérêt a été généré. Ce modèle murin s'est révélé être un modèle reproductible de la pathologie observée chez les patients porteurs de cette mutation d'intérêt en développant une myopathie mitochondriale et des signes d'atteinte du motoneurone. De manière notable, cette souris est le premier modèle murin présentant une atteinte du motoneurone ayant pour origine une mutation au niveau d'un gène mitochondrial. Notre projet de recherche a pour but de comprendre comment un dysfonctionnement mitochondrial conduit à une atteinte du motoneurone. Pour répondre à cet objectif, nous voulons caractériser la séquence des événements reliant l'atteinte mitochondriale et l'atteinte neuronale dans ce modèle murin. Le processus de mitophagie pourrait jouer un rôle important dans cette séquence d'événements. En effet, les souris porteuses de la mutation d'intérêt présentent une importante augmentation de la mitophagie dans certains organes. La mitophagie est un processus d'élimination des mitochondries anormales. Pour comprendre l'impact de la mitophagie sur les dysfonctionnements mitochondriaux et neuronaux ayant pour origine cette mutation dans un gène mitochondrial, les souris porteuses de cette mutation seront croisées avec une lignée murine établie permettant d'étudier la mitophagie *in vivo*, les souris Mito-QC. Les organes seront récupérés après la mort de l'animal pour des analyses biologiques et biochimiques (marquages immunohistochimiques, analyses de marqueurs neuromusculaires, quantification de la mitophagie). La compréhension des mécanismes reliant l'atteinte mitochondriale à la dégénérescence des motoneurones est primordiale dans le but de développer une stratégie thérapeutique.

Dans un but de remplacement, des expériences ont été réalisées précédemment sur des cellules en culture. Les expériences réalisées sur des fibroblastes issus de patients porteurs de la mutation

d'intérêt n'ont pas montré de mitophagie (en comparaison des fibroblastes contrôles). Des expériences réalisées sur des cellules de patients reprogrammées vers l'état embryonnaire et ensuite différenciées vers les cellules de l'organe d'intérêt présente un potentiel important pour remplacer et réduire l'utilisation de l'animal. Cependant, la pathologie touchant plusieurs organes, seul un modèle animal permettra de comprendre et d'étudier les conséquences multiples de cette mutation sur le processus de mitophagie et ses conséquences quant aux atteintes mitochondriale et neurodégénérative.

Un maximum de 285 souris sera utilisé pour ce projet, en fond génétique C57BL/6, qui se déroulera sur une durée de 4 ans. Parmi ces 285 animaux, 135 animaux (porteurs de la mutation d'intérêt) présenteront un phénotype dommageable, les autres animaux étant les souris contrôles. Dans un but de réduction du nombre d'animaux à utiliser pour cette étude, des statistiques prédictives ont été réalisées dans le but d'utiliser le minimum d'animaux nécessaires. Les animaux obtenus par élevage seront utilisés pour étudier le processus de mitophagie et son impact dans les atteintes mitochondriale et neurodégénérative.

Dans un but de raffinement, l'utilisation d'une fiche d'observation détaillée (en lien avec le phénotype attendu de DFT-SLA) permettant un suivi optimal des animaux sera mise en place. Les animaux seront observés hebdomadairement, ce qui permettra d'identifier précocement tout signe clinique, de stress ou de douleur. Le phénotype de DFT-SLA étant associé à une perte de poids, les animaux seront pesés une fois par semaine. Lorsqu'une perte de poids sera observée, une surveillance accrue sera réalisée (2 fois par semaine ou tous les jours suivant le pourcentage de perte de poids), de l'eau et de la nourriture gélifiés seront également ajoutés dans la cage. Si, lors de cette surveillance hebdomadaire, un stress est observé, un enrichissement de la cage sera réalisé et une surveillance accrue sera effectuée.

13313 Le déclin cognitif est défini comme un déclin progressif de la capacité cognitive avec l'âge. Bien qu'il ne conduise pas nécessairement à la démence qui impacte directement les activités de la vie quotidienne, le processus de vieillissement pourrait inclure une légère altération de la mémoire ou des fonctions exécutives éventuellement induites ou améliorées par le style de vie. Aujourd'hui, les investigations cliniques s'accordent à dire que la présence à l'âge moyen d'au moins 3 troubles du métabolisme multiplie par 2,5 le risque de développer une démence à un âge avancé. Toutefois, la complexité des tableaux cliniques (pathologies confondantes) des sujets âgés pris en charge, ne permet pas d'identifier de façon univoque le(s) lien(s) entre les troubles du métabolisme, l'âge et l'apparition d'une démence engendrée par une précipitation d'un déclin cognitif.

Nous avons développé un modèle murin préclinique à long terme (12 mois) qui reproduit la mise en place progressive de troubles métaboliques et d'un déclin cognitif léger. Ce modèle nous a permis de démontrer qu'à l'âge moyen et en dehors de toutes pathologies confondantes, ces troubles du métabolisme induisent en particulier une altération de la flexibilité et de la mémoire de reconnaissance visuelle ainsi qu'une dysfonction des vaisseaux sanguins cérébraux. Ces altérations cognitives et vasculaires s'installent de façon synchronisée avec l'augmentation du dépôt de graisse viscérale. Ces résultats vont nous permettre au travers de ce nouveau projet de développer de nouvelles perspectives d'études fonctionnelles et pharmacologiques pour comprendre l'apparition du déclin cognitif et essayer de le moduler. La mise en évidence de marqueurs électrophysiologiques et vasculaires en lien avec l'apparition du déclin cognitif représente un enjeu majeur pour un diagnostic précoce des patients à risque et est associée à l'identification de cibles pharmacologiques potentielles.

Le nombre total d'animaux envisagé sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 1875 souris de sexe mâle.

REDUCTION : L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total de 1875 souris. Le nombre d'animaux a été défini pour obtenir des résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles). Les études comportementales et la réponse à un régime enrichi présentent une

certaine hétérogénéité qui nécessite d'avoir un nombre d'animaux suffisant par lot ainsi que plusieurs lots pour valider les résultats.

RAFFINEMENT : Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux, et en étant particulièrement vigilant sur les points limites afin de respecter au mieux le bien-être animal.

REMPLACEMENT : Il s'agit d'un projet portant sur l'impact de troubles métaboliques sur la cognition avec des approches neuronales et vasculaires. Un tel projet de neurosciences intégratives ne peut être mené avec des méthodes alternatives *in vitro* et nécessite l'utilisation d'un modèle animal.

13314 Les maladies allergiques d'origines cutanées (p. ex., la dermatite atopique ou l'hypersensibilité de contact), respiratoires (p. ex., l'asthme allergique) ou alimentaires sont en plein essor dans les pays développés. Il est maintenant estimé qu'un tiers des français souffrent d'une ou plusieurs formes de maladies allergiques, dont certaines peuvent s'avérer fatales (p. ex., certaines formes d'asthmes réfractaires aux corticoïdes ou encore des chocs anaphylactiques induits par l'ingestion de cacahuètes). L'origine des diverses maladies allergiques chez l'homme est extrêmement complexe et plusieurs facteurs (p. ex., immunologique, génétique, environnemental, neuronal etc) pourraient être impliqués dans leur développement. Ce programme de recherche a pour but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement et la prévention des maladies allergiques en bloquant les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire. Devant la complexité de ces maladies, due notamment à l'implication de différents organes et types cellulaires, le recours aux modèles animaux est indispensable. De ce fait, les modèles de souris sont des éléments clé et incontournables pour étudier le développement des maladies allergiques mimant les maladies humaines. Les expériences qui seront réalisées *in vivo* ont été conçues de façon à n'utiliser que le nombre strictement minimum de souris nécessaire à l'obtention de données validées statistiquement. D'autre part, toutes les précautions seront prises pour éviter la sensation de douleur ou d'angoisse chez les animaux manipulés. Pour cela, l'ensemble du personnel manipulant les animaux sera formé de manière rigoureuse et dans le respect de la règle des 3R. De plus, les procédures seront effectuées sous anesthésie sauf contraintes expérimentales justifiées. Nous étudions l'activité des nerfs périphériques qui transmettent la douleur, nous ne pouvons donc pas utiliser d'antalgiques. Les souris seront sacrifiées dès lors qu'elles présenteront une perte de poids de plus de 20%, ou une altération de l'état général (baisse d'activité, d'appétit). Le maximum de tissus d'intérêt sera récupéré sur chaque souris et stocké en vue de répondre à d'éventuelles questions scientifiques ultérieures, sans avoir à utiliser de nouvelles souris. Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser (utilisant 2548 animaux pour la totalité des projets) contribueront à mieux comprendre le développement des maladies allergiques et potentiellement à identifier de nouvelles stratégies pour prévenir et soigner ces maladies. Une banque de tissus prélevés sur les différents modèles de souris utilisés au laboratoire sera constituée et mise à disposition de la communauté scientifique, dans le but d'éviter un emploi d'animaux redondant.

13315 La sclérose en plaque est une maladie neurologique auto-immune chronique du système nerveux central. Il s'agit de la démyélinisation progressive de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses des neurones. Ce phénomène est à l'origine du ralentissement ou de l'arrêt de la conduction nerveuse induisant une faiblesse musculaire, des troubles de la motricité, de la vision, etc. Elle touche chaque année des sujets jeunes entre 20 et 35 ans, soit environ 60 000 personnes en France.

D'une manière générale, les causes de la maladie ne sont pas bien identifiées et l'origine exacte de la pathologie reste inconnue. De même, aucune thérapie n'existe à l'heure actuelle pour soigner cette pathologie très invalidante. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase pré clinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments à viser anti-inflammatoire permettant de diminuer ou d'inhiber le développement de la maladie. La sclérose en plaque est induite par injection sous-cutanée d'une

solution composée de MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) et d'un adjuvant qui est le Mycobacterium tuberculosis inactivé par la chaleur suivie de deux injections intra-péritonéale de toxine Pertussique. Ce cocktail immunogénique permet la dégradation progressive des fibres de myéline. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 24 jours pour analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'administration de la solution à l'animal se fait par voie sous-cutanée. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës mais réversibles (une fois le pic de la maladie passé au jour 16, les animaux retrouvent progressivement leur mobilité entre 7 et 15 jours) à l'animal (qui se manifeste par une prostration, état moribond, une détresse respiratoire, des poils hérissés, une perte de poids), liées au développement de la maladie neurologique. Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les animaux sont hébergés par 5 dans des cages de 530 cm² (cage 1284L type II L). Les animaux seront mis à mort par inhalation de CO₂.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études. Une étude comportera jusqu'à 90 animaux en fonction du nombre de molécules à tester et du nombre de concentration par molécules, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la sclérose en plaque.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal (cf tableau points limites 3. 4. 13) et un cocktail anesthésique/analgésique est administré aux animaux pour limiter la douleur.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

13316 La genèse et la propagation de l'information douloureuse, repose sur l'activité électrique de neurones sensoriels spécialisés, appelés les nocicepteurs. La douleur physiologique est un signal d'alerte mais dans certaines conditions pathologiques, comme l'inflammation, le diabète, les neuropathies, les nocicepteurs connaissent des modifications moléculaires qui engendrent une réponse exacerbée aux stimuli extérieurs, responsable des phénomènes d'allodynie et d'hyperalgie. Les douleurs chroniques, idiopathiques ou non, sont particulièrement invalidantes pour les patients et altèrent profondément leur qualité de vie. Les traitements antalgiques sur le marché reposent principalement sur des anti-inflammatoires stéroïdiens, non stéroïdiens tel que l'ibuprofène, ou des opioïdes. Malheureusement ces traitements présentent au long cours de nombreux effets secondaires, ainsi que des problèmes de dépendance et de tolérance pour les dérivés morphiniques. Ainsi, le traitement de la douleur de nos jours reste très insatisfaisant et la recherche de nouveaux composés originaux est toujours un enjeu majeur de recherche et de développement. Nos travaux et ceux de la communauté internationale ont mis en évidence le rôle important d'une sous-unité α des canaux sodiques dépendant du potentiel faisant de ce dernier une cible thérapeutique particulièrement intéressante pour développer de nouveaux composés antalgiques pour traiter les douleurs inflammatoires persistantes ou chroniques. Néanmoins un certain nombre de questions restent en suspens, et une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de ce canal sont encore nécessaires. C'est à ces questions que cette étude doit répondre dans les prochaines années.

Pour réaliser ce projet, 224 souris seront utilisées afin d'observer des différences significatives sur les paramètres étudiés avec un risque α fixé à 0.05. Le choix du modèle murin pour ce projet

est irremplaçable et justifié par le fait que des lignées de souris KO pour ce gène existe. La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée ; Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Le nombre de souris par cage respectera les directives européennes du 1er février 2013, sachant que le projet utilise de jeunes adultes entre 20 et 25g, nécessitant 70 cm² par individus dans les cages. Un pré-screening *in vitro* permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. Les expériences de comportement ont été choisies afin de limiter au maximum la contention de l'animal (animal libre de ses mouvements), et l'environnement des animaux sera enrichi avec des dômes en carton. Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal.

13317 Il existe un risque non négligeable (environ 50%) de développement de bactéries dans l'urine et d'infection urinaire chez les patients équipés de sonde urinaire sur des périodes prolongées (>48h). Dans le but de diminuer la fréquence et /ou l'importance de ces infections urinaires, des sondes enduites de produits ou molécules aux propriétés antiseptiques ou antimicrobiennes peuvent être utilisées.

Avant de commercialiser ce type de sonde, il est cependant nécessaire de montrer leur efficacité. Avant de tester ce type de sonde chez le patient (étude clinique), il est nécessaire de réaliser des études précliniques dites de preuve de concept chez l'animal et en particulier chez le porc qui est reconnu pour être un bon modèle expérimental de l'appareil urinaire. Le modèle porcin n'est par remplaçable par une méthode alternative.

Avant de pouvoir réaliser ces études de preuves de concept, une étude pilote doit être menée afin de définir la taille des sondes qui devront être utilisées ultérieurement ainsi que d'adapter à la truie la méthode de pose décrite chez la femme.

Après une période d'acclimatation, les animaux seront anesthésiés. La région vulvaire sera désinfectée et la sonde sera introduite. La position correcte de la sonde dans la vessie sera vérifiée soit par observation de l'écoulement de l'urine via la sonde soit par échographie en cas de doute. En fonction de la longueur totale de la sonde et de la longueur de sonde restant à l'extérieur de l'animal, une fixation de cette sonde à l'animal pourra être réalisée afin d'éviter que celui-ci ne marche dessous. Pour chaque animal un différent diamètre de sonde sera testé.

Les animaux seront hébergés en individuel afin d'éviter qu'un animal n'arrache la sonde de l'autre. La position des sondes et un examen clinique seront réalisés quotidiennement. Ces sondes seront retirées au bout de 5 jours (raffinement).

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser 2 études.

Le nombre d'animaux sera toujours réduit au minimum et sera de 3 à 4 animaux

Au total, au maximum 8 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

13318 L'hépatocarcinome est la 6ème forme de cancer la plus répandue dans le monde. On estime que 630 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année.

Les causes majeures de HCC (HepatoCellular Carcinoma = hépatocarcinome) sont les infections virales (Hépatites C et B) et l'abus d'alcool.

Viennent ensuite les maladies auto-immunes et enfin les maladies métaboliques telle que la stéatohépatite (accumulation de graisses dans le foie) non alcoolique plus communément appelée NASH.

80% des patients atteints d'hépatocarcinome développent ce dernier à la suite d'une maladie métabolique entraînant une fibrose du foie puis une cirrhose et enfin un cancer.

Il est reconnu qu'une alimentation trop riche en graisses et en sucre associée à un mode de vie sédentaire conduit à une NASH (foie gras), qui conduit à une fibrose. La fibrose hépatique correspond à une formation excessive de matrice extracellulaire (collagène) en réaction à une inflammation du foie. Il s'agit d'un dérèglement du processus de cicatrisation destinée à remplacer

les cellules endommagées. La fibrose modifie le fonctionnement du foie et peut entraîner de graves conséquences que sont la cirrhose et l'hépatocarcinome.

En 2007, le Sorafenib, un inhibiteur de la tyrosine kinase (TKI), a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour une utilisation dans le traitement du carcinome hépatique avancé. Cependant, l'efficacité globale du traitement ciblé par Sorafenib reste modérée (prolongation de trois mois de la durée de survie). L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de cette pathologie.

L'évaluation de l'efficacité de nos molécules sera réalisée dans un modèle de rongeurs développant cette pathologie induite par un régime alimentaire enrichi en sucres et en graisses associé à l'injection d'un agent cancérogène. Le modèle décrit dans ce projet s'appuie sur une étude de la littérature scientifique. Il s'agit de mettre en évidence les propriétés préventives voire curatives de nos molécules.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de l'HCC sera réalisée au cours des 5 années couvertes par ce projet qui comptera 5460 souris.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». La fibrose hépatique menant à un hépatocarcinome est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux. Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

13319 La neurodégénérescence avec perte progressive des structures et fonctions neuronales est le facteur causal clé de troubles neurologiques dévastateurs tels que la maladie d'Alzheimer (MA). Malgré les progrès significatifs de la recherche en neurobiologie, la prévalence de ces pathologies continue d'augmenter en raison du manque de traitements curatifs. La MA est un syndrome neurodégénératif associé à une perte progressive des fonctions cognitives. Elle est corrélée à des changements histologiques incluant des plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires et la mort neuronale. Les premières lésions apparaissent dans une zone du cerveau impliquée dans l'apprentissage et la mémoire, l'hippocampe. L'apprentissage et la mémoire reposent sur la plasticité des circuits de notre cerveau, c'est-à-dire la capacité des neurones à modifier de façon durable l'efficacité de leur transmission synaptique. Les principaux marqueurs impliqués dans la MA sont : le peptide bêta-amyloïde (A-bêta), qui provient de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), la protéine Tau et la mitochondrie, centrale énergétique des cellules animales qui produit l'énergie nécessaire à tous les processus biochimiques. Les dysfonctionnements au niveau neuronal conduisent aux déficits dans la transmission synaptique et inévitablement à l'altération de l'acquisition et de la consolidation de la mémoire. De plus, un nombre croissant de données épidémiologiques a démontré un lien entre le diabète de type 2 et la MA. Cette découverte a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche pour mieux appréhender la physiopathologie des maladies neurodégénératives et ouvrir de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier dans des modèles de souris transgéniques et mutantes présentant des déficits caractéristiques de la MA :

-les modifications des réseaux neuronaux liées au génotype par des enregistrements électrophysiologiques sur coupes cérébrales.

-l'efficacité / toxicité de composés en développement sur les altérations de la plasticité synaptique qui sous-tendent les troubles d'apprentissage et de mémoire.

Pour ces études, des enregistrements électrophysiologiques permettront d'étudier les modifications du réseau neuronal induites par administration unique ou répétée de composés en développement par voie entérale (orale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire) ou par application directement sur les coupes cérébrales.

Pour les différentes études de ce projet, nous utiliserons des modèles de souris transgéniques et mutantes, présentant des altérations de l'apprentissage et de la mémoire, à savoir des modèles transgéniques de la MA et des modèles mutants du diabète. Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 6060 souris (60 souris seront dédiées aux actions de formation et de maintien de compétences).

Avantages : ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie *ex vivo* (sur coupes cérébrales) permettra de mettre en évidence les modifications des réseaux neuronaux associés à des modèles de la MA et de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement sur les modifications du réseau neuronal liées à la MA. La technique utilisée sera l'électrophysiologie *ex vivo*, c'est-à-dire sur coupes cérébrales. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones ou de neurones isolés.

Dommmages escomptés : les modèles de souris transgéniques et mutantes que nous utiliserons présentent un phénotype dommageable à l'âge étudié. Leur bien-être sera attentivement suivi durant toute la durée du projet grâce à des fiches d'observation/points limites adaptés aux modèles. Des procédures de prise en charge adaptées seront également mises en place. En cas d'administration de composés à tester, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Dans ce cas, les points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) : l'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations sont réalisées chez la souris, car il existe de nombreux modèles transgéniques associés à la MA, utilisés communément par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés. Ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

-réduction : le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire ainsi que l'analyse des résultats seront effectuées à l'aide de logiciels spécialisés. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Une observation journalière des animaux sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque modèle et voie d'administration

permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

13320 **Projet :** Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur maligne primitive de très mauvais pronostic qui se développe aux dépens des hépatocytes. Les études réalisées *in vitro* sur les lignées cellulaires et *in vivo* sur les tumeurs humaines ont permis de mettre en évidence des dérégulations au niveau des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que les récepteurs de l'EGF (EGFR), de l'IGF-1 (IGF1R) et de l'insuline (IR), ainsi que de la protéine adaptatrice EBP50/NHERF1, un régulateur d'EGFR. Afin de valider les données *in vitro*, nous souhaitons étudier dans un modèle expérimental de CHC induit chez la souris, l'implication des RTK et d'EBP50 dans ce cancer.

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

Nombre d'animaux : 192

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 192 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

13321 Les troubles du spectre de l'autisme représentent un groupe de pathologies neurodéveloppementales dont la prévalence est de 1%. Les troubles comportementaux des patients autistes (déficits d'interaction sociales, stéréotypies et intérêts restreints) s'accompagnent de comorbidités variées (anxiété, dépression, hyperactivité). Egalement, des troubles en périphérie sont associés à l'autisme avec des symptômes gastro-intestinaux (GI : constipation, diarrhée, douleurs abdominales, ballonnements), une dysbiose du microbiote intestinal et des profils anormaux de métabolites microbiens dont la synthèse est assurée par le microbiote intestinal. En retour, certains modèles murins d'autisme présentent des anomalies similaires.

La physiopathologie de l'autisme reste encore largement inconnue à ce jour, mais ces données suggèrent que des dérégulations de l'axe microbiote-intestin-cerveau pourraient participer au développement et/ou au maintien des troubles comportementaux et GI. Aussi, ceci laisse supposer que des thérapies ciblant le microbiote intestinal, comme le transfert de microbiote intestinal, pourraient être considérées chez les patients souffrant d'autisme. Leur efficacité reste néanmoins à déterminer dans des modèles animaux et chez l'humain. De plus, la compréhension des mécanismes impliqués est cruciale pour définir les thérapies optimales.

Ce projet explore l'hypothèse que nos bactéries intestinales peuvent contribuer aux troubles GI et comportementaux chez les patients autistes par le biais de leurs métabolites. Le rôle de ces métabolites sera étudié *in vitro* par criblage de leurs cibles pharmacologiques dans des lignées épithéliales et neuronales puis *in vivo* chez la souris. Le but de ce projet de recherche est d'identifier parmi ces métabolites microbiens candidats ceux capables d'induire chez la souris des anomalies comportementales et/ou gastro-intestinales et d'identifier leur mode d'action. Aussi, nous testerons l'efficacité d'une stratégie de transfert de microbiote intestinal et d'un traitement probiotique pour induire ou prévenir les anomalies comportementales et/ou GI identifiées dans le projet.

Dans ce projet, nous appliquerons la règle des 3 R :

Remplacer : En amont des expérimentations sur l'animal, nous effectuons des expériences *in vitro* dans des lignées cellulaires pour tester l'effet des métabolites sur la barrière intestinale et le système nerveux en utilisant la lignée de cellules épithéliales humaines Caco-2 et une lignée neuronale humaine SHSY5Y. Cependant, le recours à l'animal sera nécessaire pour évaluer l'impact du traitement avec les métabolites à l'échelle de l'organisme entier au niveau GI et comportemental.

Raffiner : Nos conditions d'élevage impliquent : stabulation par 4 animaux au moins, enrichissement du milieu, température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. La majorité des procédures pourront générer un inconfort faible et de courte durée, mais non dommageable pour l'animal. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi sous forme de grille de score (fournie en Annexe 2) permettra de détecter une souffrance potentielle et de décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés.

Réduire : Nous utiliserons des tailles d'échantillon garantissant une puissance statistique suffisante pour l'analyse des résultats de comportement. Ainsi, des calculs de puissance réalisés avec un logiciel dédié ont permis de déterminer au plus juste les effectifs de groupe à utiliser pour observer des effets de taille moyenne avec les tests statistiques adéquats. Un total de 4032 animaux est requis pour ce projet. Néanmoins, nous procéderons de manière séquentielle, et les résultats des procédures 1 et 2 permettront de décider des métabolites candidats les plus prometteurs, qui seront ensuite testés plus en détails dans les procédures suivantes.

13322 Les maladies fibrosantes du poumon affectent de façon significative la qualité de vie et la survie des patients. Les causes qui conduisent à cette maladie ne sont pas encore bien caractérisées ; néanmoins les poussées inflammatoires aggravent le pronostic de survie des patients. Ces maladies sont incurables et les deux seuls traitements qui existent aujourd'hui ne font que ralentir leurs progressions. Nous proposons dans ce projet de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques qui traiteraient efficacement l'inflammation afin d'améliorer la survie des patients. Dans notre laboratoire, nous travaillons sur une protéine qui joue un rôle important dans la mise en place et la progression de la fibrose. Cette protéine régule aussi l'intensité de la réponse inflammatoire.

Nous avons développé des molécules qui ciblent la protéine d'intérêt. Dans une étude précédente, nous avons montré que ces molécules réduisent l'intensité des colites (inflammation aigue du colon) dans un modèle de souris. Dans ce projet, nous souhaitons tester l'activité anti inflammatoire de nos composés sur un modèle d'inflammation/fibrose du poumon. Nous utiliserons des souris commerciales qui possèdent un système immunitaire fonctionnel mais aussi deux modèles de souris modifiées génétiquement dans lesquels l'expression de notre protéine sera absente dans certaines populations cellulaires. Ces modifications n'ont aucun impact sur le bien-être de la souris.

La fibrose pulmonaire sera induite chimiquement par l'instillation d'un composé inflammatoire et les molécules ou leur placebo (contrôle) seront administrés par voie intra péritonéale. Une fois les injections réalisées, le comportement des animaux sera suivi quotidiennement de façon à assurer une bonne gestion de la douleur, le tout en accord avec les objectifs de notre étude. L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R. Réduction : Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, une étude exhaustive de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de la non reproduction de résultats déjà publiés. De plus, nous avons réalisé une étude

statistique prévisionnelle qui nous permet de prédire le nombre minimal d'animaux qu'il faut inclure par groupe expérimental afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Raffinement : Nous avons montré l'absence de toxicité de nos composés et de leur véhicule sur des cellules en culture et sur des animaux vigiles. Nous avons choisi une technique basée sur l'instillation orotrachéale du composé inflammatoire assistée par un fibroscope, cette technique évite une chirurgie. L'instillation est réalisée sur des souris anesthésiées pour diminuer leur stress et nous utilisons un reversant de l'anesthésique pour faciliter le réveil des souris. L'inflammation marquée du poumon qui précède la fibrose (à partir du 14ème jour) est associée à une mortalité. Pour limiter au maximum la souffrance des souris nous avons établi une grille d'observation qui liste les mesures que nous prenons pour assurer le bien-être et nous avons défini des points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée. Remplacement : Nous avons utilisé des cellules en culture pour définir les concentrations actives de nos molécules. Néanmoins, seuls les modèles animaux permettent de tester la collaboration qui existe entre les différents compartiments cellulaires, en particulier les relations complexes entre le système immunitaire et les épithéliums bronchiques. Les 2740 souris que nous utiliserons dans ce projet nous permettront de caractériser les propriétés anti-inflammatoire et anti-fibrotique dans un modèle de fibrose pulmonaire et d'identifier les cibles cellulaires et moléculaires qui contribuent à cette réponse.

13323 La thérapie génique est parfois la seule approche thérapeutique pour traiter des maladies génétiques telle que la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne. Son intérêt pour le développement de stratégie innovante pour le cancer est également démontré. La thérapie génique consistant à introduire un gène médicament dans les cellules malades a démontré sa faisabilité chez l'homme avec les récents résultats obtenus par des équipes françaises. Actuellement les gènes médicaments sont introduits en utilisant des virus. Nous développons des agents chimiques pour remplacer ces virus dans le futur. Ces agents chimiques seront associés à un gène médicament pour l'introduire dans les cellules. Ces agents chimiques sont testés et sélectionnés sur la base de leur activité sur différentes lignées cellulaires. Cependant, la finalité de ces agents est d'être efficace *in vivo* et d'abord chez le petit animal. Nous souhaitons donc rapidement connaître le potentiel de ces agents pour introduire un gène médicament dans les cellules (hépatocytes) du foie de souris saines. Le foie est un organe privilégié pour la thérapie génique de plusieurs maladies génétiques telles que l'Hémophilie B. Cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal. Concernant le remplacement, cette étude ne peut être remplacée par des tests de transfert de gènes sur cellules en culture car ces derniers ne peuvent tenir compte des aspects physiologiques et de la complexité d'un organisme entier. Pour les mêmes raisons, la biologie moléculaire ne peut renseigner sur les résultats espérés chez le petit animal. A ce stade de développement, la culture cellulaire et la biologie moléculaire ne permettent de déterminer le potentiel de nos agents chimiques pour la thérapie génique.

Pour cela nous réaliserons une série d'expérience avec des souris saines auxquelles seront injectées par voie intraveineuse un gène médicament qui produira une enzyme. Pour déterminer l'efficacité de l'agent chimique, on mesurera à partir du sang collecté à différents temps, la quantité d'enzyme qui aura été secrété par les hépatocytes.

Nous estimons que pour ce projet de 2 ans il sera nécessaire de mettre en œuvre 150 souris maximum.

Les travaux seront menés en utilisant des lots de 5 souris de façon à réduire le nombre d'animaux en expérimentation et en réduisant la durée de l'expérimentation à deux semaines ce qui sera suffisant pour en tirer des conclusions.

Les travaux seront menés sur souris saines et nous n'attendons pas de dommages particuliers provoqués par les agents chimiques eux-mêmes ou le gène médicament. Les souris seront suivies tous les jours que durera l'expérience par inspection visuelle pour anticiper, le cas échéant, le développement de douleurs ou de souffrances. L'absence de socialisation des animaux, le changement d'aspect du pelage et l'absence de toilettage seront évalués quotidiennement pour anticiper une éventuelle souffrance des animaux. Les animaux suspects ou en souffrance seront mis à mort immédiatement.

13324 Le médulloblastome (MB) est la plus fréquente des tumeurs malignes du système nerveux central de l'enfant. Ces tumeurs cérébrales se développent le plus souvent au niveau du cervelet. Le taux de survie de ces jeunes patients atteints de médulloblastome reste encore faible avec des dommages importants dus à l'agressivité des traitements. Il est donc important de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer la qualité de vie de ces jeunes patients. Récemment, il a été montré que la neuropiline-1 (protéine transmembranaire) était impliquée dans la progression de cette pathologie. Nous avons déjà évalué un composé inhibant la neuropiline-1 qui a montré une bonne efficacité thérapeutique *in vivo* en association avec la radiothérapie (RT) sur 3 modèles de médulloblastomes humains greffés chez la souris en sous cutanée. Sur cette base de résultats encourageants, nous proposons de poursuivre nos investigations par une approche de greffes intracérébrales (procédure 1) plus proche de la physiopathologie tumorale. Ces tumeurs intracérébrales seront irradiées à 2 Gy/j pendant 5 jours (procédure 3) avec 2 administrations concomitantes du composé à 10 mg/kg (procédure 2). Finalement, la croissance tumorale sera suivie par une approche d'imagerie non invasive par bioluminescence pendant 5 semaines (procédure 4). Du fait de la complexité de l'environnement tumoral, il n'est pas possible de remplacer nos expérimentations par des modèles *in vitro* (Remplacement). Nous réaliserons nos expériences de façon séquentielle en commençant par les 2 modèles qui nous pensons être les plus sensibles à l'association thérapeutique (composé + RT) et dans le cas où l'association thérapeutique ne montrerait aucun effet par rapport aux monothérapies (RT ou composé seul), les expérimentations ne seront pas poursuivies sur le dernier modèle (Réduction). Pour la réalisation de ce projet, 81 souris immunodéprimées femelles âgées de 5 semaines seront nécessaires. Les animaux seront observés quotidiennement et le suivi par imagerie de bioluminescence permettra de déterminer l'évolution tumorale. Finalement, toutes les procédures seront réalisées sur des animaux anesthésiés permettant de réduire le stress potentiellement infligé. De plus, le choix de points limites relativement précoces par rapport à l'évolution de la pathologie en tenant compte notamment du volume des tumeurs, ainsi que de la présence de foyers tumoraux distants du site d'injection (métastases) permettra un arrêt éthiquement et scientifiquement acceptable des expérimentations (Raffinement).

13325 De nombreuses circonstances nécessitent d'administrer des produits anti-inflammatoires chez le chat afin de lutter contre la douleur, la fièvre et/ou un phénomène inflammatoire. La recherche tente de développer de nouveaux anti-inflammatoires pour une meilleure prise en charge des animaux.

Le but de ce projet est donc de tester en conditions réelles l'effet antalgique (contre la douleur), antipyrétique (contre la fièvre) and anti-inflammatoire de différents traitements. L'inflammation, l'hyperthermie et la douleur seront induites par une injection sous cutanée d'une solution de Kaolin au niveau d'un membre de l'animal.

L'effet du kaolin est un effet réversible avec une durée d'action de 5 à 10 jours. L'efficacité des traitements sera évaluée sur différents critères : évolution de la température rectale, boiterie, douleur à la palpation, test de locomotion, volume de la patte et/ou mesure de la force d'appui.

Un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma) est également possible.

Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire la réponse d'un être vivant, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier le produit.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales dont l'administration de kaolin, l'administration du produit à tester et des prélèvements sanguins répétés afin de suivre la pharmacodynamie et pharmacocinétique des produits administrés. Seuls des chats seront utilisés. L'administration de Kaolin se fera sous anesthésie générale et le nombre de prélèvements sanguins sera toujours réduit au minimum.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés en individuel. L'hébergement des animaux est conforme au plan d'hébergement et également conforme au programme d'enrichissement (présence de jouets dans les boxes).

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique).

Le nombre d'animaux par étude sera réduit au minimum tout en évitant de compromettre les résultats du projet lié à la variabilité inter-individuelle. Au total, 150 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

13326 Les problèmes liés à l'infarctus, notamment l'insuffisance cardiaque, est une des principales causes de décès dans le monde et nécessite le développement de thérapies ainsi qu'une bonne compréhension des mécanismes impliqués dans ce processus. Les études sur la régénération du cœur chez plusieurs modèles (mammifères, poissons téléostéens, amphibiens) suggèrent que l'ensemble des vertébrés possède cette capacité mais que celle-ci disparaît au cours du développement post-embryonnaire chez certaines espèces. Les raisons de cette perte sont encore mal connues.

Chez les poissons téléostéens (comme le poisson zèbre) ou chez les amphibiens urodèles (comme la salamandre et l'axolotl), la capacité de régénération cardiaque est forte et conservée durant toute la vie de l'animal. Par contre, chez les mammifères, s'il existe une période précoce dans le développement où la régénération cardiaque peut avoir lieu, cette capacité est très vite perdue. Chez la souris, cette capacité est perdue après la première semaine post-natale, une période connue pour être physiologiquement similaire à la métamorphose dépendante des hormones thyroïdiennes (HTs) chez les amphibiens anoures. Nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel que pourrait avoir ces HTs dans le processus de régénération cardiaque.

Récemment nous avons étudié la régénération cardiaque chez un nouveau modèle, l'amphibien anoure *Xenopus laevis*, où les HTs orchestrent la métamorphose des larves (têtards) en adultes. Nous avons montré que ces hormones jouent un rôle dans le contrôle de la capacité du tissu cardiaque à régénérer. En effet, la capacité de régénération cardiaque est forte chez le têtard, réduite durant la métamorphose pour être complètement perdue chez l'adulte, rappelant ce qui est observé chez les mammifères. De plus, nous avons établi que l'excès ou la privation en HTs altère le processus de régénération du cœur.

Dans le cadre d'une analyse comparée avec ce que nous avons établi chez le xénope, le projet vise à étudier l'influence des HTs sur la capacité de régénération du cœur chez le poisson zèbre adulte âgés de 4 à 6 mois. Ce projet est la continuité d'une étude déjà initiée chez le poisson zèbre adulte, qui avait été menée parallèlement aux travaux réalisés chez le xénope, et pour laquelle un certain nombre d'animaux ont déjà été analysés montrant des résultats concordants avec ceux observés chez le xénope.

Dans ce projet, le statut thyroïdien des poissons est modifié soit par un excès d'HTs (traitement avec la T3, forme transcriptionnellement active des HTs) soit par une privation en HTs (traitement avec de l'IOP, acide iopanoïque, inactivant les désiodases). La procédure de résection cardiaque employée dans ce projet, réalisée sous anesthésie avec du MS222 (méthode d'anesthésie standard utilisée par balnéation chez toutes les espèces aquatiques pour pratiquer une chirurgie), est basée sur une méthodologie déjà décrite et utilisée dans des travaux étudiant la régénération du cœur chez le poisson zèbre adulte. Pour analyser le processus de régénération en fonction du statut thyroïdien, nous utiliserons différents types de techniques histologique, immunologique, et transcriptionnelle. Compte tenu de l'objectif scientifique, le modèle *in vivo* ne peut être remplacé par une méthode alternative.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet (total incluant les animaux déjà analysés et issus de l'étude initiale) et justification :

Compte tenu de la variabilité biologique intrinsèque aux expériences *in vivo*, pour que les analyses soient représentatives, il est nécessaire d'utiliser un minimum de 25 animaux par condition étudiée (15 pour l'analyse transcriptionnelle, et 10 pour l'analyse immuno/histologique), divisés en sous-groupes de ~8 poissons et analysés indépendamment dans le but d'obtenir des réplicats biologiques pour chaque condition étudiée. Notre recul sur ce type de protocole expérimental

montre que ces conditions sont suffisantes afin d'obtenir des données statistiquement significatives pour les différentes techniques utilisées.

Schématiquement, il s'agit d'opérer sous anesthésie (avec le MS222) les poissons des différents groupes expérimentaux en procédant à une ablation mécanique d'une partie du ventricule au niveau de l'apex (environ 10 à 15%), puis de récupérer les cœurs des poissons après euthanasie, aux différents temps d'analyse. Pour l'analyse transcriptionnelle par RT-qPCR, les cœurs des poissons sont récupérés à 3 temps : juste avant l'amputation (T=0), puis 3 et 7 jours après l'amputation, dans le but d'obtenir une cinétique d'expression des gènes étudiés pendant la phase précoce du processus de régénération. Pour l'analyse immuno/histologique, les cœurs des poissons sont récupérés à 4 temps : à 14, 30, 50 et 90 jours après l'amputation, dans le but d'évaluer la capacité régénérative au cours du temps pour chaque condition testée. Les 5 conditions testées sont des poissons non traités (condition contrôle de référence), traités 3 jours et 10 jours avec les HTs (T3 ; 10-8M), ou traités 5 jours et 10 jours avec l'IOP (acide iopanoïque ; 10-5M).

Ainsi pour l'analyse transcriptionnelle, 3 temps x 5 conditions x 15 poissons = 225 animaux.

Pour l'analyse immuno/histologique, 4 temps x 5 conditions x 10 poissons = 200 animaux.

Au total, 425 poissons adultes sont utilisés dans ce projet.

Avantages du modèle poisson :

La possibilité d'étudier dans un contexte intégré la régénération d'un organe comme le cœur chez le poisson zèbre, ainsi que son altération suite à des modulations de la disponibilité en HTs, est une opportunité unique qui ne peut être atteinte dans des études *in vitro*.

La résection cardiaque chez le poisson zèbre, réalisée sous une anesthésie avec du MS222, est une procédure délicate mais bien décrite et bien maîtrisée (personnel formé) chez ce modèle pour étudier la régénération du cœur (raffinement). L'emploi d'une procédure similaire à celle pratiquée par d'autres laboratoires travaillant sur la régénération cardiaque chez le poisson zèbre permettra de pouvoir comparer nos résultats avec les données disponibles et publiées sur ce processus chez ce modèle.

13327 Dans le système nerveux, les cellules nerveuses ou neurones sont connectés entre eux et communiquent grâce à des molécules appelées neurotransmetteurs. La connexion entre les neurones s'appelle la synapse au niveau de laquelle le neurotransmetteur est libéré. En effet, il va pouvoir se fixer sur des molécules capables de le reconnaître, insérées dans la membrane du neurone. Ces molécules sont appelées récepteurs aux neurotransmetteurs. La force de la connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones connectés. Cette propriété qu'ont les synapses de changer leur efficacité est appelée plasticité synaptique. Elle est à la base de nombreuses formes de mémoire simples ou complexes permettant l'adaptation par des changements de comportements en réponse aux changements de l'environnement chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé. L'étude du fonctionnement des récepteurs et de la plasticité synaptique est donc importante pour comprendre les mécanismes des différents types de mémoire et de leurs perturbations.

Notre groupe a montré dans des modèles *in vitro* de neurones de rongeurs en culture, que pour pouvoir changer l'efficacité d'une synapse, les récepteurs aux neurotransmetteurs ont des mouvements latéraux très rapides dans la paroi des neurones, ce qui leur permettent d'être sollicités très vite. On a montré ainsi qu'en immobilisant les récepteurs avec des molécules particulières (comme des anti-corps par exemple), la synapse perdait sa capacité à changer son efficacité et produire une réponse modulée. Il est maintenant important de mettre en évidence clairement le lien entre la mobilité des récepteurs dans la synapse et l'activité des neurones chez un animal en cours d'apprentissage ou de mémorisation afin de progresser dans la compréhension de la mémoire, sa formation, son développement et ses troubles. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de l'immobilisation de certains types de récepteurs sur la plasticité synaptique et sur l'apprentissage chez la souris. Cette espèce est un mammifère, facile à élever et à reproduire dans des conditions contrôlées, très utilisé en neurosciences pour son cerveau dont l'organisation est proche de celle de l'homme, capable d'apprendre vite des tâches comportementales complexes. Pour pouvoir

injecter les molécules capables d'immobiliser des récepteurs, une chirurgie sera pratiquée dans une région précise du cerveau, connue pour son importance pour la mémoire, l'hippocampe.

Après récupération, les souris seront soumises à un test comportemental qui implique la mémoire pour mesurer l'efficacité des molécules. Ils devront trouver une friandise placée à différentes extrémités de branche d'un labyrinthe. Pour une plus grande motivation, donc une meilleure efficacité, les animaux seront soumis à une légère restriction alimentaire, rigoureusement contrôlée pour ne pas impacter leur état de santé. Nous escomptons obtenir des données nouvelles qui nous permettront de progresser dans la connaissance de la formation de la mémoire, du stockage des souvenirs et de leur utilisation.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives, l'étude de l'effet de l'immobilisation des récepteurs dans la formation de mémoire nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes *in vitro* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne permettent pas l'observation d'un apprentissage.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Le nombre d'animaux sera de 750 sur 5 ans. Chaque groupe expérimental est accompagné d'un groupe contrôle

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées : Les animaux proviennent d'un éleveur agréé. A leur arrivée, les animaux seront hébergés en cages collectives, garnies de litières leur permettant de reproduire un comportement naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons, pour leur permettre de construire des nids et de jouer et de ronger. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. Après un premier contrôle de leur état de santé les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et au cours des étapes de comportement, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montrera des signes de souffrance. Au cours des étapes de l'apprentissage, les animaux sont légèrement restreints alimentaires, une surveillance accrue de leur poids et de leur état général et un accès immédiat à la nourriture au constat d'un mal être. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

13328 La surface du système nerveux central (SNC) est protégée par des membranes : les méninges. La découverte récente de la diversité des populations immunes résidant dans les méninges et leur capacité à contrôler le cerveau (cognition, comportement) et l'inflammation du cerveau (migraine, méningites, sclérose en plaque, ...) ouvre de nouvelles perspectives en terme de recherche fondamentale et thérapeutique. Les cellules immunitaires les plus représentées dans les méninges sont les macrophages. Ils scannent en permanence la surface du SNC et peuvent détecter la présence de pathogènes avant qu'ils s'introduisent dans le cerveau et la moelle épinière. Mon projet a donc 2 objectifs :

1- Caractériser les macrophages des méninges à l'état de repos et suite à un stimulus microbien (lipopolysaccharide et virus de la chorioméningite lymphocytaire).

2- Comprendre les mécanismes sous-tendant une diminution de leur fonction au cours du vieillissement pour y remédier.

Afin d'évaluer les réponses inflammatoires dans le SNC et les méninges lors d'une simulation d'une infection microbienne *in vivo*, nous utiliserons des souris de type sauvage et transgéniques provenant d'établissements éleveurs, fournisseurs localisés et collaborateurs. Il est indispensable de travailler sur un organisme entier (modèle murin) pour comprendre l'induction des réponses immunitaires dans les méninges en relation avec le SNC. Puisque nous ne pouvons pas nous

affranchir du modèle animal, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux utilisés en suivant la règle des 3R.

- Réduction : nous tenterons de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en effectuant des expériences pertinentes et complètes. Nous utiliserons des tests statistiques adéquats pour planifier nos expériences. Le nombre d'individus nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs est de 12 animaux par groupe, d'où l'utilisation de 3936 souris pour l'ensemble de ce projet. Nous utiliserons plusieurs tissus du même animal (méninges, cerveau, sang) pour limiter le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement : Les souris seront hébergées dans des animaleries protégées de niveau 1, 2 et 3 en fonction de la procédure et exemptes d'organisme pathogène spécifique. Les conditions de l'animalerie sont contrôlées (température, hygrométrie, photopériode). Les cages de 530cm² seront adaptées pour limiter le stress des animaux (100cm² de surface par animal au minimum, dômes protecteurs et matériel pour la confection de nids). Les injections intracrâniennes de lipopolysaccharide (LPS) pour mimer une infection, ainsi que les infections virales des souris pourront engendrer une conséquence sur leur état de santé. La souffrance des animaux sera limitée autant que possible, par l'utilisation d'antalgiques et la détection d'un point limité précoce. Les injections intracrâniennes de LPS seront utilisées à la place d'une infection microbienne pour limiter les complications liées aux infections pathogènes. Les infections virales seront cependant nécessaires pour mieux comprendre la validité de notre modèle et le rôle des macrophages dans la physiopathologie des infections du SNC.

- Remplacement : le système que nous étudions est intégré au système nerveux central, rendant difficile toute tentative de remplacer notre modèle d'étude par d'autres organismes modèles (*C. elegans*, ...). De plus, il s'agit d'un système intégré, rendant toute approche *in vitro* peu utile pour la compréhension de ce système. Plusieurs études ont indiqué une forte similitude entre les mécanismes de l'inflammation des méninges chez l'Homme et chez la souris, indiquant que notre modèle pourra aider à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliquant l'inflammation du SNC chez l'Homme.

13329 Le syndrome de Mendelson ou syndrome d'inhalation bronchique est une affection causée par une aspiration dans les poumons de vomissements. Ce syndrome peut notamment survenir lors d'une anesthésie générale réalisée en urgence chez des patients non à jeun (exemple : césarienne). Au réveil, les patients présentent un risque élevé de vomissements en raison de l'anesthésie. De plus, l'anesthésie générale peut abolir au moment du réveil les réflexes permettant d'éviter une aspiration de matières liquides ou solides vers les poumons. Ce syndrome peut entraîner de graves complications pulmonaires (pneumonie, oedème, insuffisance respiratoire) pouvant entraîner la mort.

Les mécanismes produisant ces graves complications pulmonaires sont attribués d'une part à l'acidité sécrétée par l'estomac (acidité gastrique) et d'autre part à la présence de particules solides pouvant obstruer les voies respiratoires. La part de responsabilité de l'un ou l'autre des deux mécanismes dans le syndrome de Mendelson n'est pas bien définie. Le présent projet vise à étudier plus spécifiquement les mécanismes liés à l'acidité gastrique. Actuellement, aucun modèle animal n'existe permettant de mimer cette pathologie humaine. Il n'existe pas non plus de modèles alternatifs permettant d'étudier les mécanismes de ce syndrome.

Le premier objectif du projet est de mettre au point un modèle de syndrome de Mendelson chez le rat. Ce modèle doit mimer au plus proche la pathologie humaine. Il doit permettre d'étudier les conséquences d'une aspiration de liquide acide provenant de l'estomac. Le second objectif du projet est d'étudier les effets bénéfiques éventuels d'une réduction préventive de l'acidité du contenu de l'estomac sur le pronostic vital du syndrome de Mendelson. Ce protocole préventif serait appliqué au moment de l'admission en urgence de patients non à jeun et nécessitant une intervention chirurgicale sous anesthésie générale. L'objectif de ce traitement préventif est de réduire les risques de complications. Les effets bénéfiques de la réduction de l'acidité gastrique seront évalués par des explorations fonctionnelles de la fonction respiratoire ainsi que par une analyse des signes

d'inflammation pulmonaire et une analyse histologique des lésions pulmonaires réalisées en fin d'étude fixée à 14 jours après l'induction du syndrome.

Les complications pulmonaires présentent deux phases : une phase aigüe et une phase retardée. La phase aigüe est la conséquence directe de l'obstruction des voies respiratoires. L'acidité peut jouer un rôle aggravant compte tenu que le niveau d'acidité du contenu de l'estomac est comparable à celui de l'acide chlorhydrique. Chez l'homme, la phase aigüe du syndrome est traitée par des protocoles de réanimation impliquant notamment une oxygénation artificielle des patients. La phase retardée est traitée par des protocoles visant à soigner les signes d'insuffisance respiratoire et de pneumonie.

Le principe du modèle repose sur l'administration dans les voies pulmonaires de liquide acide provenant de l'estomac de rats donneurs à des rats receveurs chez lesquels le syndrome de Mendelson est donc induit par cette procédure. La séparation en animaux donneurs et receveurs permet d'étudier dans un premier temps les effets de protocoles thérapeutiques sur l'acidité gastriques chez les animaux donneurs. L'utilisation d'animaux receveurs permet de calibrer précisément les quantités de liquides administrés dans les voies pulmonaires. Cette stratégie en deux groupes d'animaux donneurs et receveurs a pour objectif de réduire très sensiblement le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet en cherchant à diminuer la variabilité de l'évolution du syndrome de Mendelson entre animaux. L'objectif en termes de nombre d'animaux est de ne pas dépasser 8 à 12 animaux par groupe pour voir l'effet bénéfique d'un protocole thérapeutique là où chez l'homme il serait nécessaire d'inclure plusieurs dizaines de patients pour permettre de voir cet effet bénéfique en raison de la diversité des situations rencontrées entre patients. Le suivi de la fonction respiratoire sera effectué par des techniques sensibles avec comme même objectif de réduire le nombre d'animaux par groupe. Dans la phase aigüe du syndrome, les rats feront l'objet de protocoles de réanimation analogues à ceux utilisés chez l'homme.

Le modèle est attendu comme générateur de douleurs qualifiées de sévères tant dans la phase aigüe que la phase retardée du syndrome. Sur ce point, l'objectif poursuivi est d'éviter d'exposer les animaux à ce niveau de douleur. Pour ce faire, l'administration de liquide gastrique sera réalisée sous anesthésie générale. Après le réveil, des critères précis ont été définis de façon à arrêter la poursuite des mesures dès l'apparition de signes de détresse respiratoire pouvant entraîner la mort. La décision d'arrêt de la poursuite des mesures sera prise individuellement suite à une surveillance constante pendant la phase aigüe du syndrome et des examens réalisés à intervalles réguliers et rapprochés pendant la phase retardée du syndrome. De même, le projet prévoit lors de la phase de mise au point du modèle de déterminer précisément le volume de liquide gastrique administré aux animaux receveurs de façon à ce qu'il n'entraîne pas de mortalité directe dans la phase aigüe du syndrome (raffinement).

Le choix de l'espèce s'est porté sur le rat car cette espèce est celle qui a été et est la plus fréquemment utilisée dans les études des phénomènes de reflux gastriques. La souris apparait trop petite en taille pour la réalisation des administrations de liquide gastrique dans les poumons de façon précise. Au total, le projet prévoit d'inclure un nombre réduit au maximum de 120 rats sur 5 ans.

Ce projet est requis par les autorités réglementaires en préalable aux essais chez l'homme des protocoles thérapeutiques visant à réduire préventivement l'acidité gastrique de patients opérés en urgence. Ce projet doit apporter la preuve de concept selon lequel ces protocoles ont une chance d'améliorer le pronostic vital des patients atteints de ce syndrome.

13330 Le cancer du pancréas avec près de 10000 nouveaux cas par an, est l'un des cancers les plus graves, avec une espérance de survie à 5 ans très faible (inférieure à 5%). A l'heure actuelle, la chirurgie reste le meilleur traitement possible pour les 15 à 20 % de patients dont la tumeur est opérable. Et bien que certains protocoles de chimiothérapie aient permis une amélioration de la durée et de la qualité de vie des patients, le traitement de ce cancer reste un enjeu majeur des recherches en oncologie. S'il est maintenant clairement établi que certaines cellules du microenvironnement influencent la tumorigenèse et la progression tumorale, le rôle des cellules nerveuses et notamment des fibres nerveuses infiltrant les tumeurs reste mal compris. Nous avons

dans un précédent projet, étudié l'influence du système nerveux et plus particulièrement de l'axonogenèse (innervation des tumeurs) dans le développement des tumeurs pancréatiques. Les résultats ont montré qu'il existe un remodelage séquentiel et sous-type spécifique des fibres du système nerveux périphérique (SNP) lors de la progression des cancers de type adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) chez la souris. Cependant il est nécessaire de pouvoir confirmer ces résultats dans un contexte humanisé en effectuant des expériences complémentaires.

Ce projet mène à explorer l'innervation de pièces opératoires de tumeurs pancréatique humaines, greffées en orthotopiques et en hétérotopique sur des pancréas de souris immunodéficientes. Pour cela, nous collaborons avec une équipe bénéficiant d'une tumorotheque de pièces opératoires « en dormance » c'est à dire congelées ce qui maintient au ralenti les activités vitales et permet le retour à la vie lors de la décongélation. Ces tissus humains ont été analysés et caractérisés, ce qui nous permet d'avoir accès à des données précieuses permettant une analyse approfondie de nos expérimentations. Nous aurons donc à disposition une large quantité de pièce chirurgicale pré-caractérisées.

Ce projet nous permettra d'étudier le remodelage du SNP dans des tumeurs du pancréas obtenu à partir de tissu humain. De plus, nous souhaitons corrélérer la quantité d'innervation avec le degré de différenciation et d'agressivité des tumeurs ainsi qu'avec les données transcriptomiques présentes dans la banque de donnée.

La description de cette innervation, de son rôle au sein des tumeurs du pancréas et des mécanismes impliqués est importante, elle pourrait à terme permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de mettre au point de nouveaux traitements.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés et de suivre la règle des 3R. Ainsi ce projet utilisera 172 souris.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, les études *in vitro* ne permettent pas de récapituler l'ensemble des interactions cellulaires existantes lors du développement des tumeurs. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être (BEA) des animaux sont contrôlés. La fréquence passe à plusieurs fois par jours sur les animaux présentant des tumeurs. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises.

13331 Ce projet a pour but l'exploration phénotype et la recherche de thérapies innovantes dans le cadre des maladies neuromusculaires.

L'espèce animale pour ce projet est la souris *mus musculus*, souche 129S2/SvPasOrlRj âgées de 13 semaines. Nous utilisons des souris mutées comme modèles de ces pathologies et des souris sauvages comme témoins non pathologique. Notre équipe a en outre développé un modèle murin (souche 129S2/SvPasOrlRj) par transgénèse ciblée porteur d'une mutation du gène *Lmna* (*Lmna* p. H222P) décrite chez l'homme. Ce modèle murin récapitule à l'état homozygote les caractéristiques phénotypiques de ces pathologies : atteintes des muscles squelettiques et cardiaques. Les premiers symptômes sont détectés dès 3 mois chez les mâles homozygotes et évoluent rapidement jusqu'au décès des animaux provoqués principalement par l'aggravation du phénotype cardiaque. Les points limites sont les suivants :

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

3. Anomalies pouvant entraîner une douleur intense, une détresse ou une souffrance : perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids initial de l'animal.

4. L'atteinte du muscle cardiaque mise en évidence par une fraction de raccourcissement inférieure à 15%.

Ce modèle constitue le modèle de référence pour rechercher les voies moléculaires qui sous-tendent la pathologie et pour développer des approches de thérapie génique.

Notre équipe maîtrise parfaitement ce modèle et de nombreuses études ont déjà été publiées à partir de celui-ci.

Les virus AAV (adeno-associated virus) sont des petits virus non pathogènes. Ils sont utilisés comme outils moléculaires qui permettent de délivrer un transgène actif, dans le noyau des cellules d'un organisme vivant. Ils sont considérés aujourd'hui comme les meilleurs vecteurs de transfert de gène et ont démontré leur fort potentiel thérapeutique au travers de plusieurs études précliniques.

L'utilisation de ce type de virus est parfaitement maîtrisée au sein de notre équipe de recherche, et leur utilisation a déjà obtenu plusieurs agrémentations par le passé.

Ce projet cherche à mettre en évidence des nouvelles voies moléculaires impliquées dans l'apparition du phénotype du muscle strié (cardiaque et squelettique) et à déterminer les voies d'administration optimum des AAV pour une expression maximum des transgènes d'intérêt.

La méthode d'évaluation de la fonction cardiaque est non invasive et nécessite uniquement une anesthésie légère. L'évaluation est réalisée par échocardiographie.

La méthode d'évaluation de la fonction du muscle squelettique est réalisée post mortem. L'évaluation est réalisée par la mesure de la force musculaire.

Ce projet, nécessite un nombre total de 90 animaux et respecte pleinement les règles de réduction, de remplacement et de raffinement. Le modèle *in vivo* est indispensable dans le cadre de ce projet. Le plan expérimental déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation, tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne jusqu'à leur euthanasie (suivi de poids hebdomadaire, évaluation du bien-être général, vérification de l'absence de nécroses ou escarres).

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

13332 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

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

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes :

-La maladie d'Alzheimer : la surexpression de l'enzyme clé du métabolisme cérébral du cholestérol à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles (amyloïde et tau) permet de restaurer les déficits mnésiques.

-La maladie de Huntington : La surexpression de cette même enzyme à l'aide d'un vecteur AAV permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle. Nous avons récemment identifié un nouveau vecteur viral dans le laboratoire qui passe efficacement la barrière hématoencéphalique et permettra ainsi d'éviter une approche invasive d'injection intracérébrale remplacée par une injection intraveineuse

Le but final de l'étude est donc d'établir la preuve de concept de l'injection intraveineuse de ce vecteur dans nos 2 modèles souris de la maladie de Huntington et d'évaluer le bénéfice clinique.

Remplacement : Le recours aux modèles animaux est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. De plus, les souris Huntington sont bien caractérisées. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

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

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (250) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter et les temps d'analyses.

13333 Les défauts primaires d'éruption (DPE) correspondent à l'échec d'éruption partiel ou total d'une ou plusieurs dents, sans obstacle mécanique. Chez l'Homme, certaines formes isolées de cette pathologie sont dues à des mutations du gène PTHR1 codant pour le récepteur de l'hormone parathyroïdienne. Les critères diagnostiques reposent sur une analyse des données cliniques, radiologiques et moléculaires. Les mécanismes physiopathologiques sont encore mal connus et aucun traitement n'existe, les tractions orthodontiques ayant un fort taux d'échec.

L'objectif de ce projet est de développer un modèle animal de DPE afin d'étudier les voies de signalisation moléculaires qui entrent en jeu et les interactions entre l'os et la dent en formation. Si ce modèle est validé, il pourrait par la suite servir à la mise au point de traitements.

Le modèle animal choisi est la souris car c'est un modèle de référence classiquement utilisé dans l'étude du développement et de l'éruption dentaire. De plus, les animaux génétiquement modifiés nécessaires pour ces travaux ne sont disponibles que chez la souris. Afin de REDUIRE le nombre d'animaux et après analyse statistique pour une période de 5 ans, ce nombre ne dépassera pas 1920. Afin de réduire les effectifs, une étude pilote sera menée pour déterminer si une simple diminution d'expression de PTHR1 permet d'obtenir les défauts d'éruption. L'approche *in vivo* ne peut pas être REMPLACÉE par des techniques d'analyse *in vitro* dans la mesure où nous étudierons la complexité des interactions entre les différents tissus (dent, os, ligament alvéolo-dentaire, gencive) et les mouvements éruptifs impossibles à reproduire *in vitro*. Concernant le RAFFINEMENT, nous faciliterons la prise alimentaire chez les souris n'ayant pas de molaires fonctionnelles, pour cela un aliment gélinifié appétent sera distribué. Chez les souris présentant un défaut d'éruption, une intervention chirurgicale pour tenter de corriger ce défaut sera mise en œuvre sous anesthésie générale et une couverture analgésique post-opératoire sera instaurée. Une surveillance sera mise en place dès le jour de l'intervention et un suivi journalier de leur bien-être sera effectué. Les rongeurs seront hébergés au sein de l'animalerie en conditions standards, au sein de portoirs ventilés, avec un environnement enrichi (coton et nids) et une alimentation adaptée (aliment gélinifié pour les souris présentant un défaut d'éruption). Des points limites précoces ont été établis préalablement afin de limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Si les animaux au cours de l'étude présentent des signes précoces de douleur, d'inconfort ou de détresse (changements de comportement : animal prostré et isolé du reste du groupe, perte de poids et

d'appétit, variations de leur apparence physique), l'expérimentation sera stoppée. Ces potentiels signes de douleur seront évalués et scorés à partir d'un tableau de référence, permettant de juger si l'animal devra être mis à mort pour stopper l'expérience.

13334 Les polyphénols sont exclusivement des molécules d'origine végétale. Les fruits, les légumes et les boissons dérivées sont la principale source de composés phénoliques dans notre alimentation. La présence de ces composés dans notre régime alimentaire serait bénéfique pour notre santé du fait notamment de leurs propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Cependant, ces effets santé dépendent fortement de la biodisponibilité des polyphénols. Or, malgré les doses ingérées relativement élevées (apport journalier moyen d'environ 1,2 g/j), les polyphénols sont très peu absorbés et les taux circulants (plasmatiques) de polyphénols dans notre organisme sont extrêmement faibles (1-5 μM). Ceci est en partie dû au fait que les polyphénols sont complexés/piégés par les fibres ou les protéines et sont peu bio-accessibles. Ainsi, les polyphénols transitent dans le tube digestif et se retrouvent au contact du microbiote intestinal qui est capable de les libérer des complexes fibres ou protéines et de les métaboliser en une grande variété de métabolites qui pourraient participer de manière significative à l'effet santé des polyphénols.

On sait par ailleurs que la fermentation lactique est un moyen de conserver les fruits et légumes et d'améliorer leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles. La valeur santé de ces produits est toutefois peu étudiée même s'il a été montré par des études *in vitro* que les fruits fermentés présentaient des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires qui pourraient être dues à la libération de polyphénols sous l'action du ferment sur la matrice végétale.

Face à ces constats, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact potentiellement positif sur la santé d'une stratégie nutritionnelle basée sur une supplémentation alimentaire en un jus de fruit mixte (50% pomme / 50% ananas) riche en polyphénols, et fermenté ou pas.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat adulte (n=144). Le modèle rat est le modèle rongeur le plus proche de l'Homme qui permet de suivre le devenir de microconstituants alimentaires (polyphénols) à la fois dans le tube digestif (bioaccessibilité) et dans le sang (biodisponibilité) et de déterminer l'impact des polyphénols et de leurs métabolites microbiens sur le stress oxydant et la réponse inflammatoire. Ce protocole ne pourrait pas être réalisé en utilisant un modèle *in vitro*. Les rats seront élevés en cage individuelle, ce qui permettra de remplacer temporairement l'eau de boisson par le jus de fruit (2 ml / jour). Après une période de supplémentation (ou pas) en jus de fruit de 4 semaines, nous induirons chez le rat adulte une inflammation intestinale et systémique avec du Dextran Sulfate de Sodium (DSS) en utilisant un protocole déjà éprouvé. Les animaux seront étudiés avant et après la période d'induction de l'inflammation conjointement ou pas à l'ingestion des jus de fruit. Toutes les mesures seront effectuées post-mortem ou sur fèces. Le nombre de rats par lot (n=12) a été calculé au plus juste pour permettre de détecter avec une bonne puissance statistique les effets du traitement nutritionnel sur la réponse du microbiote intestinal et de l'animal. Ce projet pourrait fournir des bases solides pour envisager une application chez l'Homme.

13335 La capacité d'un individu à s'adapter à son environnement et à y répondre de la façon la plus appropriée est sous-tendue par ses fonctions cognitives. Beaucoup de pathologies neurologiques ou neuropsychiatriques ont en commun une altération de ces fonctions cognitives, avec pour conséquence une détérioration des capacités adaptatives des individus dans leur environnement. En France, les troubles psychiatriques concernent un adulte sur 4, soit 27% de la population. Les perturbations des fonctions cognitives observées suite à un trauma cérébral, à l'épilepsie, à la schizophrénie, à la maladie d'Alzheimer (MA), ou encore au vieillissement normal ont de fait des origines très différentes. Cependant, l'étude approfondie des systèmes et réseaux cérébraux et leur dysfonctionnement dans ces pathologies ont permis d'établir certains traits communs. Toutes ces altérations ont en effet en commun une perturbation des propriétés neuronales au niveau cellulaire, induisant une dégradation des propriétés intégratives des réseaux cérébraux localement. On observe alors des activités cérébrales aberrantes, se traduisant par une perturbation des capacités

de perception, d'intégration, d'acquisition et/ou d'exécution, en fonction des réseaux neuronaux spécifiquement altérés.

On sait aujourd'hui que le fonctionnement cérébral est sous-tendu par les activités synchrones de populations de neurones, permettant d'organiser le flot d'informations et de réguler avec précision l'activité neuronale, phénomènes indispensables au bon déroulement des processus cognitifs en général, et mnésiques en particulier. En ce sens, les interneurons inhibiteurs à parvalbumine (PV) représentent une population neuronale particulière : ces neurones contrôlent et synchronisent l'activité de grandes populations de neurones et permettent le contrôle d'oscillations cérébrales visibles sur un électroencéphalogramme (EEG), qui témoignent du traitement cognitif supérieur des informations. Un dysfonctionnement des neurones PV entraîne ainsi une perturbation des oscillations cérébrales qui pourrait être à l'origine des troubles cognitifs associés à certaines pathologies, notamment la maladie d'Alzheimer et la schizophrénie.

Le but de ce projet de recherche est de disséquer les liens entre le fonctionnement des neurones PV et les processus mnésiques sains et pathologiques. Il est centré sur l'idée que manipuler la fonction inhibitrice, en particulier l'activité des neurones PV et les oscillations qu'ils génèrent, a des effets bénéfiques dans le cadre de la MA et de la schizophrénie. Pour cela nous allons :

- 1) Caractériser les oscillations cérébrales au cours des processus d'acquisition et de rappel d'une tâche mnésique (reconnaissance d'objets, de lieux, ou de congénères) chez les souris saines, et modèles de la MA et de la schizophrénie ;
- 2) Caractériser les modifications anatomo-fonctionnelles des neurones PV dans le cortex et l'hippocampe de souris modèles de la MA et de la schizophrénie ;
- 3) Manipuler les neurones PV par des approches pharmacologiques, ou génétiques, et en évaluer les conséquences sur les oscillations cérébrales et les capacités mnésiques des animaux.

Nous pourrions ainsi évaluer les bénéfices comportementaux d'une activation spécifique des interneurons PV de souris transgéniques modèles de la MA ou de la schizophrénie. Ce projet permettra de déterminer si stimuler l'activité des interneurons permet d'améliorer efficacement les capacités mnésiques des animaux, malgré la pathologie. Les approches utilisées et les données obtenues pourront également s'appliquer à la compréhension d'autres maladies neuropsychiatriques, telles que l'autisme.

En prenant compte de la nécessité de tester différentes stratégies et d'effectuer l'ensemble des contrôles permettant de garantir la validité des résultats, la réalisation de ce projet nécessitera au maximum l'utilisation de 1600 souris sur une période de 5 ans (dont 100 souris sauvages, 900 souris modèles d'Alzheimer, 600 souris modèles de la schizophrénie).

Le modèle *in vivo* ne peut être remplacé par une méthode alternative. Le nombre de groupes expérimentaux est défini de manière à limiter au minimum le nombre total d'animaux utilisés. Cependant, afin d'assurer la validité des conclusions de l'étude, il est nécessaire de prévoir des groupes d'individus contrôles négatifs (souris non-transgéniques et/ou injectées avec des constructions virales contrôles). Le nombre choisi de souris par groupe représente l'effectif minimal nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante pour les comparaisons de plusieurs groupes (test statistique de comparaisons de moyennes entre plusieurs groupes) dans les tests comportementaux ou les analyses électrophysiologiques. Tous les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation. Afin d'assurer un suivi optimal du bien-être animal, notamment ceux subissant une chirurgie, une surveillance jusqu'au réveil puis quotidiennement sera effectuée de manière à identifier d'éventuels signes d'infection ou de douleur (hyperactivité puis isolement et indifférence par rapport au milieu extérieur, diminution du comportement exploratoire, attitude prostrée avec dos voûté, expression faciale modifiée, fuite ou défense à la manipulation, vocalises). Les animaux présentant de tels symptômes seront euthanasiés.

Nous bénéficions depuis 2012 d'agrément ministériels pour l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés.

13336 Les travaux pratiques (TP) d'échographie et de sémiologie de l'appareil génital de la vache (11 séances par an d'octobre à novembre, une séance par étudiant) ont pour objectif d'approfondir les enseignements théoriques de physiologie de la reproduction et de sémiologie de l'appareil génital.

Les objectifs généraux de cet enseignement pratique sont :

- (1) utiliser l'échographie et la palpation transrectale de l'appareil génital de la vache pour appréhender les bases physiologiques du cycle œstral et de la gestation de la vache,
- (2) Susciter précocement l'intérêt des étudiants pour les animaux de rente,
- (3) Initier les étudiants à une démarche diagnostique et à des techniques professionnelles.

Afin de préparer les séances de travaux pratiques et pour limiter le nombre d'animaux utilisés ainsi que le nombre d'exams, les étudiants réalisent des exams sur des appareils génitaux de vaches à différents stades physiologiques qui sont récupérés à l'abattoir (réduction). Les travaux pratiques réalisés chez l'animal qui sont indispensables à la formation du futur praticien qui se destine à la médecine rurale ne sont dispensés qu'à la moitié des étudiants afin de réduire les manipulations des animaux (remplacement, réduction).

Une convention établie avec un éleveur permet la mise en pension chaque année du mois de juillet au mois de décembre d'un total de 12 bovins, généralement 11 génisses et une vache. Le nombre total d'animaux utilisés sur une période de 5 ans est de 60. En dehors des séances de TP, les bovins sont hébergés dans un pré et ont accès à un abri. Ils sont rentrés dans une étable à stabulation entravée juste avant le début des séances de TP et ramenés dans le pré à la fin des séances. Pendant les séances, les bovins ont accès à un abreuvoir et sont nourris (raffinement).

Les bovins sont inséminés avant le début des séances de travaux pratiques comme ils l'auraient été dans leur élevage d'origine en vue d'une lactation qui aura lieu dans l'élevage à l'issue de la gestation.

Les séances de TP sont réparties sur 6 à 8 semaines, à raison de 1 à 2 séances de 2 heures par semaine pour des groupes de 7-8 étudiants. Au cours des séances, les étudiants, encadrés par deux enseignants, réalisent des exams de l'appareil génital des bovins par palpation transrectale et échographie. Chaque étudiant réalise des exams sur 4 à 5 bovins à des stades physiologiques différents et le nombre d'exams par bovin est de 3 à 4 par séance de TP. Au cours de chacune des séances, une vaginoscopie est réalisée sur une seule vache afin de réduire le nombre de manipulations. Ces exams sont identiques à ceux qui sont pratiqués par le vétérinaire dans un élevage.

Au cours des séances, les étudiants sont encadrés par deux enseignants qui contrôlent le nombre d'exams par animal et veillent à l'absence de signe de douleur ou de souffrance au travers de l'observation de la rumination.

En cas d'irritation de la muqueuse rectale, détectée par un léger saignement, les exams sont interrompus.

13337 Le présent projet vise à caractériser le rôle d'une protéine (NFkappaB), actrice cruciale de la cancérogenèse, impliquée dans le développement de leucémies/lymphomes aigües. Ce type de pathologie est assez rare (125 nouveaux cas/an en France) mais possède une fréquence élevée chez les enfants de 2 à 5 ans. Ce qui explique qu'il est très difficile de travailler sur cette pathologie. Des études *in vitro* préliminaires ont permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués dans la formation de ces lymphomes. Nous disposons d'un modèle murin où l'un de ces gènes est invalidé. Ces souris vont développer spontanément un lymphome vers l'âge de 20 semaines. Elles seront croisées avec des souris dépourvues de notre protéine d'intérêt NFkappaB. Grâce à ces souris doublement modifiées nous pourrions comprendre le rôle de NFkappaB dans le développement du lymphome mais aussi la part du système immunitaire dans le contrôle de la maladie. Le ciblage de NFkappaB fait aujourd'hui partie de l'arsenal thérapeutique anti-cancer, il est donc nécessaire de bien comprendre, *in vivo*, comment se développe le lymphome en présence ou non de cette protéine et si des modifications génétiques peuvent améliorer ou non le pronostic vital lorsque ce type de cancer est diagnostiqué. Pour ce projet, nous devons utiliser 200 souris commerciales et 580 souris

d'élevages, soit 780 souris au total pour une durée de 5 ans. Pour satisfaire au remplacement, notre modèle murin va nous permettre de mettre en place une tumorothèque qui sera utilisée par la suite pour faire des expériences *in vitro*. Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons à la fois les souris mâles et femelles issus de nos élevages et les souris de génotype sauvage seront utilisées comme contrôles. Pour satisfaire au raffinement, nous emploierons une stratégie de croisement qui produira uniquement le nombre d'animaux nécessaires. L'étude de la protéine NFkappaB qui est centrale dans le contrôle des réactions inflammatoires nous empêche d'utiliser de produits analgésiques de type AINS. Nous avons donc établi une grille de score avec des points limites précoces et adaptés pour détecter le lymphome suffisamment tôt pour réduire la souffrance animale au maximum tout en conservant une parfaite exploitation scientifique des résultats.

13338 L'utilisation d'extraits de plantes dans l'aliment des volailles connaît un intérêt croissant pour renforcer la robustesse des animaux, pour limiter l'usage des antibiotiques, et pour contribuer à des pratiques d'élevage de volailles utilisant moins de molécules de synthèse. L'objectif de cet essai est d'évaluer la capacité d'extraits de plantes à renforcer les défenses naturelles (anti-inflammatoire, anti-oxydantes) des volailles en conditions proches du terrain.

Cet essai, conduit dans un bâtiment expérimental avec des poulets élevés en parquets (groupes de 40 poulets) s'inscrit dans un projet global, dont les étapes précédentes ont permis de définir les extraits végétaux d'intérêt (Mélisse et Ginseng), leur dose d'intérêt, les marqueurs sanguins et moments de prélèvement permettant d'évaluer leurs effets. Les précédents essais avaient pour objectifs d'apporter des éléments de méthode. Ici, nous souhaitons évaluer en conditions proches du terrain, l'intérêt de 2 extraits de plante (Mélisse et Ginseng) choisis pour leurs propriétés anti-oxydante, anti-inflammatoire et immuno-régulatrice en comparaison de groupes témoins non supplémentés. Les extraits sont apportés dans l'aliment, sur toute la durée d'élevage. Sur le terrain, pour des raisons géographiques, d'organisation et de coût, toutes les volailles ne suivent pas le même itinéraire technique, ne sont pas élevées dans les mêmes conditions. En effet, l'attente des œufs à couvrir avant incubation peut varier de 5 à 18 jours, après éclosion les poussins peuvent attendre 12 à 48 heures, dans des conditions de confinement, de température et de transport variables, avant d'arriver à l'élevage et d'accéder à l'aliment. De même, la litière et l'aliment sont également variables d'un élevage à l'autre. Avant l'arrivée à l'élevage, les poussins puisent leurs ressources dans le sac vitellin (jaune de l'œuf) pendant les jours qui suivent l'éclosion, mais il est maintenant bien démontré que leur environnement précoce influence le comportement des poulets, leurs performances de production et leur sensibilité aux maladies.

C'est pourquoi, nous proposons de comparer les effets zootechniques, de bien-être et de santé, des extraits de plante en conditions expérimentales de mise en élevage dégradées (D) et de les comparer à 2 groupes témoin, un groupe de poulets élevés en conditions D, sans supplémentation alimentaire en extrait de plante, et un groupe de poulets élevés en conditions optimales (T) sans supplémentation alimentaire en extrait de plante. Cet essai permettra de répondre à la question suivante : est-ce que l'ingestion d'extraits de Mélisse ou Ginseng permet de renforcer les défenses naturelles de poulets de chair en conditions d'élevage dégradées et donc de limiter l'effet négatif des conditions de pré et post éclosion les moins favorables.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif appliqué du projet en zootechnie et santé, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*, ces démarches ont été mises en œuvre précédemment pour sélectionner les extraits, les marqueurs sanguins de santé ainsi que le nombre et les moments de prélèvements.

Réduction : Un effectif de 1440 poulets nous permet de constituer 36 groupes de 40 poulets. Ce design permet d'évaluer chacune des 4 conditions expérimentales sur 9 groupes de 40 poulets (9 répétitions) : 2 conditions avec extraits végétaux et une condition sans extrait, toutes les trois placées en situation D et une condition témoin T placée en situation d'élevage optimal.

Des prélèvements de sang seront effectués à J14 et J31 sur 18 poulets par condition. A chaque date de prélèvement, les 2 mêmes animaux par parquet seront prélevés pour analyser des indicateurs sanguins de leur état de santé. L'expérimentation ne porte que sur des poulets mâles. Ces effectifs sont nécessaires et suffisants pour pouvoir tirer des conclusions significatives en

tenant compte de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue pour ces observations et analyses biologiques...

Raffinement : Les poulets seront élevés au sol en conditions proches du terrain à une densité inférieure au maximum autorisé en élevage. Ils seront élevés en parquet, c'est à dire par groupe de 40 et auront accès à l'aliment et à l'eau de boisson à volonté. Les animaux auront la possibilité d'explorer, se percher et des interactions avec leurs congénères tout au long de l'étude. Ils seront visités deux fois par jour afin de détecter précocement tout problème. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entrainera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

13339 Comprendre le lien entre l'alimentation et la santé représente un réel challenge face à une épidémie mondiale de maladies et pathologies métabolique telles que l'obésité et le diabète de type 2. Ces maladies sont induites par une dysrégulation du métabolisme énergétique et glucidique. Ces dernières années, les pistes de recherche pour la lutte contre ces maladies s'orientent vers les interactions entre les protéines et le métabolisme énergétique et glucidique. En effet, il est connu que l'ingestion de protéines induit un effet satiétogène qui pourrait s'expliquer par la formation de peptides bioactifs issus de la digestion. Ces peptides exerceraient une action sur les mécanismes de régulation périphérique de la prise alimentaire et sur l'homéostasie glucidique.

L'objectif de cette expérimentation est de :

- vérifier l'interaction entre les protéines et les métabolismes énergétique et glucidique
- tester l'hypothèse que la nature et l'origine des protéines induiraient des différences de réponse biologique.

Ce protocole serait une étape de criblage attestant l'activité des protéines sur la régulation périphérique de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique et une méthode de discrimination positive de ces protéines afin de sélectionner celles présentant le meilleur effet. Le choix des meilleures protéines mènera à une étude plus approfondie de la population peptidique générée par la digestion et ainsi permettre l'identification d'un peptide type qui permettra une meilleure compréhension des différents mécanismes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.

Cette expérimentation consisterait d'une part à tester l'effet de différentes protéines agro-alimentaires administrées par gavage chez des rats (64 rats sur la durée du projet) sur :

- le métabolisme intestinal glucidique grâce à un test de tolérance oral au glucose
- le métabolisme énergétique en mesurant l'effet de ces protéines agro-alimentaires d'origines diverses sur la prise alimentaire et la sécrétion d'hormones satiétogènes suite à des études sur la prise alimentaire et des prélèvements sanguins.

Des tests *in vitro* sur lignées cellulaires d'origine intestinale sont pratiqués au laboratoire afin de doser les hormones satiétogènes produites après contact des cellules intestinales avec les différentes protéines agro-alimentaires préalablement digérées par un protocole de digestion gastro-intestinale simulée. Malheureusement ce test ne permet pas de mettre en évidence l'effet des hydrolysats protéiques sur la prise alimentaire directement. A cette étape, l'utilisation des animaux est donc indispensable.

Les procédures expérimentales sont conçues pour respecter la règle des 3R et limiter le nombre d'animaux utilisés :

- Principe de remplacement : Il n'existe pas de méthodes alternatives ou de substitution nous permettant d'étudier le rôle *in vivo* d'hydrolysats de protéines naturelles. L'utilisation du rongeur (rat Wistar) nous permet de suivre le poids et la prise alimentaire individuelle des animaux et de doser toutes les hormones liées à la régulation de la prise alimentaire.
- Principe de réduction : Le nombre d'échantillons testés ainsi que leurs concentrations est réduit grâce au test de criblage *in vitro*.
- Principe de raffinement : Les animaux sont surveillés tous les jours afin d'évaluer la présence de signes cliniques modérés de détresse au cours de leur hébergement. Les critères et signes qui permettent d'évaluer le niveau de douleur ou de stress ou la détresse des animaux ont été dégagés

sur la base des critères établis par Morton et Griffiths (1985). Chaque procédure expérimentale sera réalisée par un personnel habilité. Lors des manipulations, les stratégies de raffinement des expériences (pièce calme, dispositions pour diminuer l'angoisse des animaux) seront réalisées par le personnel habilité. Lors des procédures expérimentales, les critères et signes permettant d'évaluer la vigilance des animaux et la présence de signes cliniques de détresse/douleur seront particulièrement étudiés. Si un animal présente des signes cliniques de détresse au cours d'une expérimentation, celui-ci sera rapidement euthanasié pour éviter toute souffrance.

13340 Malgré des avancées significatives dans les technologies d'imagerie médicale, il n'existe actuellement aucun outil pour assister les professionnels de santé au cours d'une chirurgie colorectale. Les chirurgiens doivent se reposer sur leurs sens de la vision et du toucher afin d'identifier les tissus malades devant être retirés, des tissus sains qu'il faut préserver. Cette absence de guidage est particulièrement critique au cours du traitement du cancer colorectal. Dans le cas du cancer du côlon, une anastomose mal réalisée suite à une colectomie résulte en de sévères complications jusque dans 15% des cas. Dans le cas du cancer rectal, une identification inadéquate des zones de résection est responsable d'un taux de récurrence du cancer de 30%. De nouveaux outils d'assistance chirurgicale pour ces procédures sont donc fortement attendus.

L'hypothèse portée par cette étude est qu'une lumière proche infra-rouge, en traversant profondément les tissus vivants, interagit avec des constituants moléculaires endogènes, à savoir l'oxy- et la désoxyhémoglobine, l'eau et les lipides, ce qui donne des informations concernant la perfusion des tissus, leur oxygénation, leur hydratation et leur métabolisme.

Le but de cette étude est donc de développer un nouveau dispositif médical capable d'obtenir en temps réel, sous forme d'image, les informations endogènes clés, citées préalablement, au cours d'une chirurgie colorectale afin d'aider les chirurgiens dans leur prise de décision.

Afin de tester ce nouveau dispositif, deux modèles animaux seront utilisés. Le premier consistera en un modèle porcin d'anastomose et d'ischémie du colon, la taille et l'anatomie de cette espèce permettant de reproduire des conditions chirurgicales très proches de la situation clinique chez l'homme. Pour cette étude, 50 porcs seront nécessaires. Le deuxième modèle fera appel à un modèle murin de cancer colorectal, il est en effet possible d'induire la maladie chez la souris grâce à des modifications génétiques. Pour cette deuxième étude, 70 souris seront nécessaires.

Ce projet sera donc réalisé sur un effectif total de 120 animaux dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacement : Après un début de développement du dispositif d'imagerie grâce à des approches *in silico* (numériques) et *in vitro* (substrats de synthèse, tissus, organes isolés), le recours à l'animal s'avère nécessaire pour avancer dans la validation de cette nouvelle technologie. Il s'agit de démontrer l'efficacité du dispositif en temps réel au cours d'une chirurgie en quantifiant des paramètres biologiques (oxygénation des tissus et métabolisme) dans un modèle d'anastomose et d'ischémie du colon et dans un modèle de cancer colorectal. Le but est de distinguer des tissus sains de tissus cancéreux pour guider le chirurgien dans son opération. Cette étape chez l'animal est indispensable afin de pouvoir envisager par la suite la mise en place d'essais cliniques chez l'homme.

Réduction :

Le nombre de mesures réalisées par animal a été optimisé (plusieurs segments d'intestins d'un même animal seront étudiés) afin de réduire le nombre d'animaux au strict nécessaire pour obtenir des résultats significatifs statistiquement. Les études seront réalisées par étapes, avec des phases préalables de validation et d'optimisation des modèles sur de faibles effectifs.

Raffinement :

Toutes les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale avec gestion de la douleur peropératoire, les animaux sont euthanasiés en fin de chirurgie sans réveil de l'anesthésie. La surveillance et les soins aux animaux avant l'intervention sont assurés par une équipe qualifiée de zootechniciens, vétérinaires et chirurgien. La Structure en charge du bien-être animal

accompagne le projet dans sa mise en œuvre, avec les conseils du vétérinaire désigné qui prendra les dispositions nécessaires au maintien du bien-être des animaux.

13341 TITRE DU PROJET : Identification des marqueurs endothéliaux suite à une inflammation pulmonaire

(Durée du projet : 1 an)

But du projet : la recherche appliquée et translationnelle.

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme qui cherche à neutraliser et éliminer un stimulus d'agression extérieure puis à restaurer l'intégrité du tissu atteint. Ce processus implique la participation des cellules du système immunitaire. Dans les maladies neuro-inflammatoires, on suspecte qu'une inflammation périphérique d'un organe « barrière » (comme le poumon), par le biais d'une agression environnementale, puisse impacter l'histoire de la maladie neurologique elle-même.

Le poumon est un organe particulièrement exposé à l'environnement. Les études chez l'homme permettent d'affirmer que l'exposition au tabac, aux solvants organiques ou que les infections des voies aériennes sont associées à une aggravation de maladies neuro-inflammatoires ou neurodégénératives telles que la sclérose en plaques. En effet, des études montrent que les patients atteints de sclérose en plaques présentent un nombre de rechutes (apparition et/ou aggravation de troubles neurologiques) plus important lorsqu'ils ont une atteinte respiratoire. De plus, des données sur des modèles animaux de sclérose en plaques ont mis en évidence que le renforcement du microbiote pulmonaire engendrait une pathologie moins sévère tandis que la présence de toxines respiratoires génère une maladie plus grave. Bien que ces mécanismes soient encore mal compris, des études préliminaires montrent que cela peut être dû au recrutement de cellules immunitaires spécifiques dans le poumon.

Ainsi, ce projet vise à mieux caractériser l'inflammation pulmonaire afin de prédire et diagnostiquer plus précisément la survenue et/ou l'aggravation des maladies neuro-inflammatoires. Ceci permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour pouvoir diagnostiquer plus précocement cette inflammation pulmonaire (grâce à un examen d'imagerie moléculaire de l'inflammation comme l'IRM) et ainsi proposer des traitements plus précoces et plus adaptés.

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

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine des pathologies neuroinflammatoires. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant l'inflammation pulmonaire (par administration de lipopolysaccharides ; LPS) chez la souris. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier ce type d'inflammation. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. L'expérience de l'équipe de recherche sur l'inflammation permet d'appliquer au quotidien le raffinement des conditions de manipulation de ces animaux. De plus, le nombre d'animaux a été réduit en prenant en compte les tests de puissance statistiques réalisés.

En prenant en compte ces recommandations, un total de 220 souris sera utilisé lors de ce projet.

Mots clefs : Inflammation pulmonaire ; imagerie moléculaire ; biomarqueurs.

13342 Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules souches pluripotentes induites pour le traitement de la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est une maladie du cerveau qui se traduit par des troubles moteurs dus à la mort progressive et accélérée de cellules appelées

neurones dopaminergiques dans une région précise du cerveau : la substance noire. Ces neurones localisés dans la substance noire envoient des projections vers le striatum (autre région du cerveau spécialisée dans la fonction motrice).

Une des approches thérapeutiques expérimentales de la maladie de Parkinson consiste à greffer des neurones fœtaux dopaminergiques dans la substance noire. Chez les patients parkinsoniens, des essais cliniques de transplantation de neuroblastes provenant de fœtus humains ont abouti à certaines améliorations motrices, mais n'ont pas encore atteint un niveau justifiant leur utilisation en routine. Un des problèmes importants de greffe de neurones fœtaux est la disponibilité des cellules, ainsi que les nombreux problèmes éthiques que soulève leur utilisation. Nous proposons donc ici de tester une nouvelle source de cellules pour la transplantation : les cellules souches pluripotentes induites. Ces cellules sont obtenues à partir des propres cellules du patient (biopsie de peau), reprogrammées en cellules souches, puis différenciées en précurseurs de neurones dopaminergiques avant d'être greffées dans un modèle de souris de la maladie de Parkinson.

Un protocole complet nécessite l'utilisation de 360 animaux. La règle des 3R a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

13343 Le cancer reste une maladie souvent mortelle, pour laquelle la recherche de traitements innovants est requise. Le succès récent des inhibiteurs de « checkpoint » immunitaire (anti-PD-1, anti-CTLA4) dans divers cancers a renouvelé l'intérêt pour les vaccins anti-tumoraux.

L'induction d'une immunité contre un antigène donné par vaccination à l'aide d'adjuvants classiques (alum, émulsions...) permet d'obtenir facilement des anticorps circulants. Ces anticorps sont cependant peu efficaces pour lutter contre les tumeurs. L'obtention de lymphocytes cytotoxiques (CTL), plus intéressante dans le cancer, est plus difficile à obtenir car les adjuvants disponibles actuellement donnent généralement des réponses faibles, ne permettant pas d'induire une réponse antitumorale satisfaisante.

Récemment, il a été montré que la mélanine utilisée en tant qu'adjuvant vaccinal permettait d'induire une réponse lymphocytaire CTL contre un antigène peptidique.

Notre but est de poursuivre le développement d'un adjuvant optimisé à base de mélanine synthétique afin d'obtenir à terme un vaccin thérapeutique utilisable pour le traitement des cancers humains. Nous nous concentrerons dans un premier temps sur le glioblastome, le cancer cérébral le plus fréquent chez l'adulte, pour lequel il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement satisfaisant.

Dans ce projet, nous étudierons les réponses immunitaires et antimorales induites par diverses préparations vaccinales à base de mélanine et d'antigènes cibles qui sont mutés ou anormalement exprimés par les cellules tumorales.

Seules les formulations sélectionnées à l'issue d'études *in vitro* approfondies seront évaluées *in vivo*.

L'étude chez l'animal est indispensable pour mesurer une réponse immunitaire par lymphocyte et la Souris constitue l'espèce la plus adaptée pour les études immunologiques. Nous allons également utiliser un modèle de glioblastome syngénique implanté en sous-cutané chez le Rat, car un tel modèle n'est pas disponible chez la Souris.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au nombre minimum nécessaire et suffisant pour permettre l'analyse statistique des données. Au total, 1260 animaux seront utilisés dans ce projet, 1140 souris et 120 rats.

Les protocoles de ce projet utiliseront des modèles validés par la littérature, permettant d'obtenir des résultats reproductibles. Les expériences nécessiteront des procédures peu traumatisantes (injections sous-cutanées des préparations vaccinales et utilisation de modèles tumoraux implantables en sous-cutané). Pour éviter toute souffrance, les procédures se feront sous anesthésie générale. Dans les modèles tumoraux, une surveillance quotidienne sera mise en place et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Enfin, les corrélations entre les résultats obtenus chez l'animal et les résultats des études *in vitro* seront étudiées en permanence dans l'objectif de remplacer le modèle *in vivo* par la prédiction *in vitro* lorsque cela sera possible.

La réalisation de ce projet permettra la sélection d'un candidat vaccin pour le traitement du glioblastome, dont nous poursuivrons le développement pharmaceutique avant d'initier les essais cliniques chez l'Homme.

13344 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) touchant près d'un million de personnes en Europe, dont 120 000 en France. De par sa nature chronique récidivante et les conséquences invalidantes qu'elle entraîne, la MC représente aujourd'hui un problème de santé publique majeur, dont l'incidence ne cesse de croître dans les pays européens et nord-américains. Principalement localisée au niveau de l'iléon distal et du colon, cette maladie multifactorielle se caractérise généralement par un dysfonctionnement de la barrière épithéliale, des lésions muqueuses ulcératives et une hyper-activation du système immunitaire intestinal en réponse à des facteurs environnementaux et/ou infectieux chez un hôte génétiquement prédisposé. A ce jour, plusieurs facteurs impliqués dans l'étiologie de la MC ont été identifiés. C'est le cas de nombreux facteurs environnementaux et infectieux tels que certains additifs et régimes alimentaires ou encore d'un déséquilibre de la composition du microbiote intestinal dit dysbiose. Cependant, il est difficile de savoir si cette dysbiose est une cause ou une conséquence de la MC et on peut s'interroger sur le rôle aggravant des populations majoritaires et le rôle potentiellement bénéfique des populations sous-représentées. De manière intéressante, 50% des patients atteints de MC iléale sont porteurs de souches adhérentes et invasives de *Escherichia coli* (AIEC) de phylogroupe B2 et D, capables de coloniser anormalement les lésions iléales aiguës et chroniques. Chez certains patients prédisposés, leur prévalence pourrait être à l'origine de l'inflammation intestinale initiatrice du développement de la MC. Parallèlement, des études ont montré qu'un régime alimentaire de type occidental, riche en matières grasses et en sucres (HF/HS), pouvait provoquer une dysbiose intestinale associée à une prévalence des souches AIEC impliquée dans le déclenchement d'une inflammation à bas grade pouvant initier la MC. Il est donc probable que des facteurs dysbiotiques tels que les régimes alimentaires puissent jouer un rôle dans l'étiologie de la MC en favorisant la colonisation des AIEC.

Une meilleure compréhension des interactions entre les souches AIEC et un microbiote associé à une alimentation HF/HS, permettrait d'identifier des populations microbiennes capables d'inhiber et/ou contrôler la colonisation des bactéries AIEC. De plus, la compréhension des mécanismes impliqués dans la dysbiose induite par l'alimentation permettrait quant à elle de mieux cibler les populations microbiennes néfastes, notamment par l'utilisation de régimes alimentaires spécifiques visant à moduler le microbiote. A plus long terme, ce travail permettra d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer la qualité de vie et le pronostic des patients atteints de MICI en manipulant spécifiquement le microbiote intestinal.

L'approche envisagée repose sur l'utilisation d'un modèle murin susceptible aux infections par les souches AIEC. Ces animaux seront soumis à des régimes alimentaires de différentes compositions et, dans certains cas, infectés par des souches AIEC. Ils ne seront soumis à aucun prélèvement invasif.

Conformément à la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale, cette étude est conforme à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Tout d'abord, le nombre total d'animaux nécessaire a été réduit dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet et est estimé à 256. De plus, afin d'optimiser l'utilisation de chaque animal, un maximum d'échantillon sera prélevé et les échantillons seront mutualisés afin de maximiser le nombre d'analyse réalisées.

Enfin, pour des raisons éthiques, cette étude ne peut se faire chez l'Homme et il n'existe, à ce jour, aucune méthode d'expérimentation *in vitro* alternative pour étudier les mécanismes mis en jeu dans les MICI.

Ainsi, l'objectif 1) prévoit l'étude de la dysbiose induite par plusieurs alimentations de compositions variées grâce à l'utilisation de 128 animaux. L'objectif 2) vise à étudier le rôle de cette dysbiose sur la colonisation et l'infection par des souches AIEC et, par conséquent, sur le déclenchement et le maintien de l'inflammation intestinale pouvant être à l'origine de la maladie de Crohn. Nombre d'animaux estimés à 128. Ce projet a été dessiné sur 5 ans.

Quel que soit le groupe expérimental, les animaux seront suivis au cours du temps, hébergés dans des cages enrichies et dont la litière sera changée de manière hebdomadaire. Une observation quotidienne sera réalisée et les animaux seront immédiatement sortis du protocole s'ils présentent deux des critères suivant : une perte de poids supérieure à 20% ; un dos voûté, un poil dru ou une démarche traduisant un mal-être ; du sang dans les fèces ou de la diarrhée.

13345 L'objectif de ce projet est de mieux caractériser l'effet d'un composé ototoxique, l'oxaliplatine, au niveau de l'oreille interne. L'oxaliplatine est un sel de platine de troisième génération utilisé dans le cadre du traitement du cancer colorectal. Cette molécule entraîne de nombreux effets indésirables, notamment une atteinte des nerfs périphériques aigue ou chronique. Nous soupçonnons un effet neurotoxique de l'oxaliplatine sur le nerf vestibulo-cochléaire. De nombreuses données cliniques suggèrent que les patients ayant reçu un traitement à base d'oxaliplatine présentent des troubles de l'oreille interne qui peuvent être parfois subtiles et difficiles à détecter. En effet, bien que les patients présentent des seuils d'auditions normaux, des troubles d'intelligibilité dans le bruit sont présents, ce qui suggère une neuropathie. Il a également été montré *in vitro*, que les traitements à base de platine peuvent induire une dégénérescence des cellules sensorielles de la cochlée. L'étude ainsi que la meilleure caractérisation des effets de ces médicaments chez l'animal sont une nécessité pour envisager, par la suite, une meilleure prise en charge des patients traités. Pour cela, le traitement de souris CBA/J selon la même procédure qu'en clinique nous permettrait de disposer d'un modèle animal stable représentant les atteintes de l'oreille interne. En effet, la souris CBA/J possède un système auditif proche de celui de l'homme ainsi qu'une audition stable dans le temps. L'utilisation d'animaux dans ce projet est indispensable, les tests auditifs et posturo-locomoteurs ne peuvent être réalisés par des approches alternatives. Les méthodes d'enregistrements électrophysiologiques des potentiels évoqués ont été choisies pour leur caractère mini-invasif (placement d'électrodes sous-cutanées après anesthésie). Le minimum d'animaux possible sera utilisé pour avoir des résultats significatifs et prévoir d'éventuelles pertes (présence d'otites d'oreille moyenne qui entraînent des perturbations auditives ou vestibulaires). Au total, 120 animaux seront nécessaires, après estimation à l'aide de la formule de taille d'échantillon (réduction). Nous utiliserons 4 groupes de 30 animaux : d'une part un groupe contrôle et un groupe de souris traitées pour les tests posturo-locomoteurs, d'autre part un groupe contrôle et un groupe de souris traitées pour les tests électrophysiologiques. En effet, il est nécessaire d'implanter un plot crânien au préalable (afin de fixer la tête de l'animal) ce qui perturbe la lecture de différents items comportementaux et crée un risque d'infection en piscine. A la suite de l'implantation du plot crânien, les animaux bénéficieront d'un suivi post-opératoire (deux à trois fois par jour) pendant une semaine (si nécessaire, des traitements antidouleurs seront administrés). Tous les animaux bénéficieront également d'un suivi quotidien dans le but de vérifier les états de stress ou de douleur. Les critères d'évaluations des points limites sont divisés en deux catégories, absolu et déterminant. Les points limites déterminants entraineront un suivi plus régulier (deux à trois fois par jour) accompagné de traitements antidouleurs. L'évolution en points limites absolus entrainera l'euthanasie de l'animal. A la fin, les animaux seront sacrifiés afin de procéder à une étude des tissus de l'oreille interne.

13346 *Escherichia coli* (*E. coli*) est une bactérie naturellement présente dans la flore intestinale car elle représente 80% de la flore intestinale. La plupart des souches de cette bactérie sont sans danger pour la santé bien que certaines sont à l'origine d'infections intestinales plus ou moins graves. Elle empêche d'autres souches de bactéries pathogènes de coloniser la flore intestinale. Si la plupart

des souches d'E. coli sont inoffensives, certaines sont pathogènes. Les pathologies généralement associées aux souches E. Coli pathogènes sont des infections urinaires, des diarrhées, des gastro-entérites, des méningites ou encore des septicémies.

Une infection urinaire est une infection bactérienne de l'urètre (urétrite) ou de la vessie (cystite). Elle peut remonter jusqu'au rein et provoquer alors une pyélonéphrite. Ce sont les infections bactériennes les plus fréquentes, quel que soit l'âge.

Cette bactérie est devenue résistante à de nombreux antibiotiques. Sa multi-résistance aux médicaments rend son traitement dans certains cas difficiles. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique qui consiste à étudier l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti-inflammatoire.

Ce projet a pour but d'étudier l'effet de nouveaux pro-biotiques à caractère anti-inflammatoire dans un modèle d'infection urinaire induite par l'administration d'une bactérie : Escherichia coli (E. coli).

UTI89 est une souche d'Escherichia coli (O18: K1:H7) uropathogène (UPEC) qui a été récupérée à partir d'un patient souffrant d'une infection de la vessie aiguë. Les UPEC ont un cycle de vie complexe au niveau de la vessie où elles provoquent des infections urinaires aiguës ou récurrentes.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'administration de la bactérie à l'animal se fait sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de l'infection dans la vessie.

Les animaux sont suivis pendant la durée de l'expérimentation.

Les traitements sont administrés avant (traitement préventif) ou après (traitement curatif) l'administration de E. coli par voie orale, intra-péritonéale, sous cutanée, intraveineuse ou transurétrale. 20h après administration de E. coli (traitement préventif) ou 14 jours après infection (traitement curatif), les souris sont mises à mort pour analyser différents paramètres immunologiques, histologiques et microbiologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité *in vivo* des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et l'inflammation de la vessie. Ce modèle peut induire 0 à 20% de mortalité.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études : une étude comportant jusqu'à 90 animaux en fonction du nombre de molécules à tester et du nombre de concentration par molécules, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant l'infection urinaire par Escherichia coli. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

-Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien être et d'éviter au maximum leur douleur tout au long de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal. De plus l'administration de la bactérie se fait sous anesthésie.

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

13347 Les tumeurs cérébrales (TC) sont des tumeurs très agressives pour lesquelles le traitement de référence est la chirurgie, associée à la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie. Pour les TC inopérables, la RT est la référence. Les progrès réalisés dans la prise en charge des patients atteints de TC ont permis une augmentation substantielle de la survie des patients. Néanmoins, ces patients se plaignent d'un côté de déficits cognitifs majeurs pendant la phase de traitement et à plus long terme lors de la phase de rémission, et de l'autre d'un état de fatigue important après le

traitement, ce qui impacte directement leur qualité de vie. Les mécanismes sous-jacents aux effets de la RT sur la cognition ne sont pas bien connus. Ainsi, il est nécessaire d'étudier les effets de la RT sur le tissu cérébral sain afin de proposer à ces patients un moyen de récupérer les fonctions cognitives affectées par le cancer et ses traitements ainsi qu'aborder la récupération « après-cancer » pour améliorer leur qualité de vie. Le projet proposé a pour but d'évaluer les effets de l'irradiation encéphalique sur la structure et la fonction du cerveau, sur les fonctions cognitives, sur la fatigue et sur la masse musculaire chez le rat. Nous évaluerons également l'impact de l'activité physique, comme outil thérapeutique potentiel, sur ces paramètres.

L'hypertension artérielle chronique est une affection qui affecte 25 % de la population adulte mondiale. Il est bien connu que cette affection non seulement représente un facteur de risque majeur pour plusieurs pathologies cérébrales (ex AVC, démences, y compris de type Alzheimer), mais aussi un facteur aggravant. En effet, l'hypertension artérielle altère, entre autre la microcirculation cérébrale et ainsi exacerbe les dommages cérébraux à la suite d'une atteinte donnée. De ce fait, nous proposons d'utiliser conjointement des animaux hypertendus afin de tester notre hypothèse selon laquelle présence d'une hypertension artérielle augmente les dommages cérébraux et les déficits cognitifs radio-induits.

Des retombées sont attendues avec ce projet puisqu'il devrait mettre en évidence d'une part, les dommages cérébraux radio-induits et leurs conséquences sur la cognition et la fatigue et d'autre part, l'intérêt thérapeutique de l'activité physique sur la récupération neurologique et physique. Cette étude sera réalisée en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner : les animaux seront hébergés aux normes requises ; le personnel participant au projet est formé et les inspections du bien-être des animaux seront réalisées quotidiennement. De plus, toutes les mesures visant à réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux seront entreprises, notamment en appliquant une anesthésie et une analgésie appropriées. Réduire : grâce à l'utilisation au préalable de tests statistiques appropriés et à l'utilisation de techniques d'investigation non invasives (imagerie IRM, tests comportementaux), le nombre d'animaux nécessaire pour permettre une puissance des résultats sera réduit au minimum. Remplacer : le rat représente un modèle de choix pour étudier les effets de l'irradiation sur le cerveau et sur les performances cognitives, il ne peut être remplacé par une méthode alternative. Le nombre estimé d'animaux utilisés est de 160 rats répartis en 8 groupes.

13348 Avec 44 872 nouveaux cas estimés en 2017 le cancer colorectal représente la deuxième cause de décès par cancer en France. Pour ce projet, nous nous intéressons aux mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à l'initiation et à la progression des tumeurs coliques et intestinales. Dans ce contexte-là, nous nous focalisons plus particulièrement sur un type cellulaire peu connue de l'épithélium intestinal, les cellules tuft. Ces cellules ont été décrites dans les premières étapes de la tumorigenèse intestinale, gastrique et pancréatique et nos résultats montrent que ces cellules sont capables de promouvoir la tumorigenèse intestinale. A l'heure actuelle, il a été décrit que les cellules tuft, i) sont capables de réguler le microenvironnement immunitaire lors d'une infection parasitaire, et ii) jouent un rôle de sentinelle via l'expression de récepteurs et de canaux ioniques impliqués dans la détection de métabolites bactériens intestinaux. De nombreuses études chez l'homme ainsi que chez la souris ont permis de mettre en évidence une altération du microbiote au cours du développement du cancer colorectal. Celui-ci est modifié de manière très précoce dans les tumeurs bénignes et évolue au cours de la progression tumorale.

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les cellules tuft seraient capables de détecter des modifications du microbiote intestinal entraînant la mise en place d'un microenvironnement immunitaire pro-tumoral. Nous avons mis en évidence la capacité des cellules tuft à moduler certaines populations de cellules immunitaires lors de l'initiation tumorale. De plus, nos données préliminaires suggèrent que le rôle immuno-régulateur des cellules tuft serait dépendant de la composition du microbiote. Pour ce projet, nous évaluerons le rôle de sentinelle des cellules tuft dans l'initiation et la progression tumorale. Nous testerons l'implication de certains récepteurs et canaux ioniques spécifiques des cellules tuft dans la régulation du microenvironnement immunitaire et le développement des tumeurs intestinales.

Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». (1) Ce projet fait intervenir plusieurs composantes de l'intestin, le microbiote, le système immunitaire intestinal et les cellules tuft, nécessitant donc l'utilisation de modèles intégrés tel que des modèles murins transgéniques. (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries. Les animaux feront l'objet d'un suivi scrupuleux des points limites, en utilisant une grille d'évaluation spécifique. Toutes altérations de l'état général des animaux ainsi que des signes de douleur entraîneront une prise en charge adaptée. (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques et ainsi minimiser le nombre d'animaux à utiliser. Nous utiliserons des animaux des deux sexes sans a priori, ceci permettant de réduire le nombre d'individus à produire. Chaque cohorte sera optimisée de façon à réaliser un maximum de prélèvement (Tissus intestinal pour extraction ARN, ADN et protéine et pour analyse histologique, prélèvement du caecum et des fèces pour analyse du microbiote) pour répondre à un maximum de question avec une seule cohorte, quand cela est possible. Nous utiliserons 3 lignées transgéniques différentes, pour un total de 410 souris.

13349 La calcification vasculaire est fortement augmentée chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) et représente un facteur de risque d'événements cardiovasculaires (CV). Le taux de mortalité CV excessif des patients atteints d'IRC, l'absence d'un test diagnostique facile et non invasif de la calcification et l'indisponibilité actuelle d'un traitement pour réduire la calcification nécessitent d'identifier de nouveaux régulateurs. Le traitement devrait être préventif. Les nouvelles options thérapeutiques devraient préférentiellement être basées sur une meilleure compréhension des processus de calcification vasculaire afin de permettre une thérapie spécifique à l'avenir.

Notre projet fait suite à une saisine précédente (projet 1109) et a pour but d'étudier des inhibiteurs de la calcification vasculaire, de comprendre leur mode d'action ainsi que les répercussions sur les organes comme le coeur et le rein.

Grâce à un projet collaboratif international (EU Research Framework Programme: Innovative Training Network "CaReSyAn") et le financement européen associé, nous avons la possibilité d'utiliser des molécules nouvelles qui sont actives *in vitro* sur la calcification cellulaire. Plus particulièrement, nous évaluerons les effets de quatre produits précédemment sélectionnés (étude *in vitro*) par un partenaire. Pour déterminer leur efficacité dans l'organisme entier, nous projetons une étude sur le modèle de rat dit « VDN » qui développe une calcification vasculaire après une injection unique de vitamine D3 et administration ponctuelle de nicotine.

Les travaux permettront de valider l'efficacité préclinique de ces nouveaux composés destinés à prévenir la calcification vasculaire dans ce modèle animal.

Pour réaliser cette étude, il faudrait 120 animaux pour évaluer les molécules à la fois chez l'animal sain et l'animal présentant une calcification vasculaire. Cependant, pour réduire le nombre d'animaux et recherchant principalement un effet chez l'animal VDN, ces composés ne seront pas administrés chez le rat sain. Donc, nous proposons d'étudier un groupe témoin sain non traité, nécessaire pour comparaison des expressions géniques (n=8), et 5 groupes VDN, un non traité et quatre traités, de 16 rats chacun pour pallier la variabilité de la calcification vasculaire dans ce modèle et pour compenser la mortalité induite par l'hypervitaminose, estimée à environ 10%. L'étude nécessitera donc l'utilisation de 88 rats (au lieu de 120) sur 5 ans. Les traitements seront administrés à l'aide de pompes osmotiques implantées sous la peau ce qui permet d'éviter l'inconfort d'un gavage quotidien. Il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'étudier la pression artérielle et l'interaction avec les vaisseaux et le coeur. Cette étude s'inscrit dans la prévention, la prophylaxie, le diagnostic et le traitement des maladies liées à la calcification vasculaire chez l'homme.

13350 But du projet : Recherche appliquée et translationnelle

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central. Elle se caractérise par une attaque de la myéline des patients par leur propre système immunitaire. Une

composante neurodégénérative, en lien avec la démyélinisation, contribue également à la mise en place des symptômes. Il existe plusieurs formes de SEP : dans la majorité des cas, le déroulement de la maladie se distingue par la succession de périodes de poussées et de rémissions, de durée et de fréquence variables, correspondant à des cycles d'apparitions de symptômes et de récupération totale ou partielle ; dans un nombre plus restreint de cas, la maladie se déroule selon une aggravation constante des symptômes, sans cycle de poussées et rémissions. D'un point de vue physiopathologique, les cycles de poussées et rémissions correspondent à des phases de démyélinisation et de remyélinisation, associés à des statuts neuroinflammatoires différents. Ces derniers peuvent engendrer, au cours de la maladie, l'apparition de dommages axonaux irréversibles (constituant la composante neurodégénérative de la maladie). Plus de deux millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde, dont 100 000 en France. L'apparition de la SEP se situe typiquement entre 20 et 40 ans. Elle constitue pour cette raison la deuxième cause d'handicap moteur du jeune adulte. La prise en charge de la maladie consiste en des traitements des phases de poussée (par corticothérapie) et des traitements de fond, associant kinésithérapie et prise en charge médicamenteuse. Si cette prise en charge permet d'améliorer la qualité de vie des patients, il n'existe à ce jour aucun traitement médicamenteux permettant de guérir la SEP.

L'objectif principal de ce projet est de caractériser le rôle du système d'activation du plasminogène et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de pouvoir ainsi proposer de nouveaux traitements dans cette pathologie.

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

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la sclérose en plaques. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant en partie les caractéristiques de la SEP : l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier la SEP. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids ...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. L'expérience de l'équipe de recherche sur l'EAE permet d'appliquer au quotidien le raffinement des conditions de manipulation de ces animaux. De plus, le nombre d'animaux a été réduit en prenant en compte les tests de puissance statistiques réalisés.

En prenant en compte ces recommandations, un total de 1820 souris sera utilisé lors de ce projet.

Mots clefs : Sclérose en plaques, système d'activation du plasminogène, Encéphalite auto-immune expérimentale.

13351 Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales qui ont acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme et prolifèrent indéfiniment pour former une tumeur maligne et/ou s'échappent de leur lieu d'origine pour développer des tumeurs secondaires (métastases) dans d'autres organes.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Les études réalisées *in vivo* ne sont entreprises qu'après avoir prouvé que les candidats anticancéreux sont bien efficaces dans des tests cellulaires *in vitro*, sur les cibles choisies puis avoir étudié leur profil pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisation et élimination) dans l'organisme. La détermination de ces paramètres permettra de choisir la voie d'administration, la forme galénique et surtout d'adapter le schéma posologique pour obtenir des concentrations conduisant à une efficacité optimale de la molécule.

Les modèles *in vivo* permettent de mettre en évidence l'activité d'un composé au sein de l'organisme complet et ne peuvent pour l'instant être remplacés. Pour pouvoir effectuer ces évaluations *in-vivo*, préalables à un passage en essais précliniques et cliniques, il est indispensable d'utiliser un modèle tumoral maîtrisé et bien caractérisé, permettant de mimer la pathologie humaine à travers l'implantation de cellules tumorales ou de fragments tumoraux dans un modèle rongeur.

Ce projet va ainsi consister à déterminer chez le rat les conditions optimales de greffe de tumeurs (d'origine humaine ou de rat) et leurs caractéristiques de croissance tumorale afin de disposer de modèles fiables et robustes utilisables pour l'évaluation de candidats médicaments. Ce projet est un préalable scientifique aux études de pharmacodynamie et d'efficacité de candidats médicaments.

Par rapport aux modèles souris plus classiquement utilisés en recherche en oncologie, les modèles de xéno greffe de rat ne sont réalisés qu'en deuxième intention, plus particulièrement dans la phase de développement préclinique après avoir démontré l'activité et l'efficacité antitumorale de ces produits chez la souris. Au vu de leur physiologie, de leur métabolisme plus proche de l'homme, ces modèles de rats sont déployés pour confirmer et/ou compléter des résultats déjà obtenus chez la souris et permettent à la fois d'évaluer l'efficacité et la toxicité de nos molécules réduisant ainsi également le nombre d'animaux utilisés (3R).

La greffe de tumeurs issues de patients nécessite que le rat ait un système immunitaire très réduit afin d'éviter les réactions de rejet ou de régression spontanée. Les souches de rat utilisées dans ce cas présentent donc un déficit dans leur système immunitaire (elles sont dites immunodéprimées) et montrent une sensibilité accrue à tous les agents pathogènes classiquement rencontrés dans notre environnement. De ce fait, elles sont préservées de tout risque infectieux en étant hébergées dans un secteur « protégé » de l'environnement extérieur.

Pour la greffe de tumeurs d'origine de rat, les rats sont dits immunocompétents, c'est-à-dire que leur système immunitaire est parfaitement fonctionnel. En effet, certains traitements anti-cancéreux, comme l'immunothérapie ou la thérapie ciblée, nécessitent la présence du système immunitaire pour être actifs et efficaces.

Une pré-sélection, par recherche bibliographique, des conditions expérimentales à tester (pour chacune des lignées tumorales à étudier) est réalisée avant le démarrage des études. Elle permet de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Sur la base de ces informations, différentes concentrations de cellules tumorales ou de fragments tumoraux sont injectées en voie sous-cutanée, intradermique ou en intra-mammaire et la croissance tumorale est ensuite suivie au cours du temps.

Deux techniques d'évaluation de la croissance tumorale peuvent alors être employées : par pied à coulisse ou par imagerie optique (bioluminescence ou fluorescence). Ces 2 techniques, non invasives pour l'animal seront choisies en fonction des besoins expérimentaux. Le pied à coulisse permet une mesure rapide du volume de la tumeur chez l'animal vigile. La bioluminescence permet une détection plus précoce des tumeurs ainsi qu'une détection de la prolifération métastatique pour certains types de tumeurs, chez le rat anesthésié pendant la durée d'acquisition des données. Les deux permettent d'effectuer des mesures non douloureuses pour l'animal (raffinement) et de suivre l'évolution des tumeurs au cours du temps, ceci concourant à la réduction du nombre de rats nécessaires à une étude.

L'état général des rats est surveillé quotidiennement et les volumes tumoraux sont mesurés au moins 2 à 3 fois/semaine permettant ainsi d'identifier les éventuels signes de souffrance qui pourraient survenir et appliquer les points limites pré-définis, si nécessaire. Tout au long de l'étude, les rats sont hébergés en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de bandelettes de papier kraft et de bâtonnet en bois à ronger, est apporté de manière à favoriser leurs comportements naturels.

Ces études vont permettre de déterminer les meilleures conditions de greffe sur la base des nombreux paramètres qui vont pouvoir être recueillis, comme la vitesse de croissance tumorale, le pourcentage de prise de la greffe tumorale tout en générant un minimum de signes cliniques. Une consultation de notre service bio-statistiques sera réalisée en fonction des lignées à étudier et des

données de bibliographie, afin d'établir les designs, plans d'expérience et constitution des groupes. Ce projet est donc primordial puisqu'il va permettre d'adapter les conditions et le nombre de rats nécessaires à greffer pour la conduite des études ultérieures pour sélectionner de nouveaux candidats médicaments.

Compte tenu du nombre de lignées tumorales pouvant être étudiées sur 5 ans (2 à 3 modèles de tumeur par an), on estime à 600 le nombre de rats nécessaires pour ce projet.

13352 Les travaux pratiques (TP) de détermination du stade du cycle œstral de la chienne (11 séances par an d'octobre à novembre (1 séance / étudiant)) réalisés au cours de la première année de formation ont pour but d'illustrer les enseignements théoriques de physiologie de la reproduction et de reproduction des carnivores.

Nous disposons dans notre chenil entre septembre et décembre de chaque année d'au moins 9 jeunes chiennes adultes en excellent état de santé. Les chiennes sont hébergées en groupe et ont un accès quotidien à l'extérieur. Des jouets sont mis à leur disposition dans les boxes ainsi que des tablettes qui leur permettent de grimper ou de se reposer au-dessous. Elles sont gardées dans nos locaux au maximum 3 ans avant adoption. Les chiennes utilisées ne sont pas spécifiquement achetées et hébergées en chenil pour ce TP. Il s'agit de chiens qui sont prévus pour expérimentations de classe légère voire modérée.

Les séances de TP sont réparties sur 6 à 8 semaines, à raison de 1 à 2 séances par semaine pour des groupes de 8 étudiants (répartis en binômes).

Chaque année, quatre chiennes parmi les 9 chiennes adultes, à des stades différents du cycle œstral, sont utilisées par séance de TP et chaque chienne est utilisée au cours d'au maximum 6 séances de TP par an. Les chiennes sont utilisées au cours de 2 ou 3 années universitaires et un maximum de 30 chiennes est utilisé pour une période de 5 ans.

Avant la première séance de TP, le stade du cycle œstral des 9 chiennes est évalué afin de déterminer les chiennes utilisées lors des premières séances. En fonction des besoins, les chaleurs sont induites chez une chienne à l'aide d'un implant sous-cutané de desloréline (SuprerolinR) mis en place sans anesthésie locorégionale, 9-10 jours avant la séance de TP. Etant donnée la durée des chaleurs chez la chienne (en moyenne de 18 jours), ce traitement concerne au maximum 5 chiennes par année.

Au cours de ces séances, les binômes d'étudiants réalisent des examens cliniques et biologiques sur une des 4 chiennes. L'examen clinique des chiennes (examen de l'appareil génital externe et des mamelles, palpation trans-abdominale, vaginoscopie, frottis vaginal) est encadré par un enseignant vétérinaire. Le prélèvement sanguin réalisé en vue du dosage de la progestérone est effectué par l'enseignant au début de la séance. Les examens cliniques et biologiques réalisés sont identiques à ceux qui pourraient être pratiqués dans une clinique vétérinaire. La mise en place du vaginoscope n'est pas réalisée par les étudiants pour éviter de répéter cet examen qui peut irriter la muqueuse vaginale. Une démonstration de vaginoscopie est réalisée par l'enseignant sur une chienne au stade proœstrus ou œstrus du cycle. Cet examen est complété par le visionnage d'une endoscopie filmée, réalisée à différents stades du cycle de la chienne.

Le recours à l'animal est indispensable à la formation à l'examen clinique de la chienne (examen de l'appareil génital externe, de la muqueuse vaginale et des mamelles) qui est mis en œuvre dans le cadre du suivi de reproduction de la chienne mais aussi du diagnostic des pathologies génitales et que doit maîtriser le praticien vétérinaire. Les chiennes sont habituées à être manipulées et font l'objet de l'attention des étudiants qui sont encadrés par deux enseignants au cours des examens cliniques. Les examens biologiques sont rapides et des mesures sont mises en œuvre pour réduire au maximum l'inconfort des chiennes (aiguilles de prélèvement très fines, humidification de l'écouvillon vaginal).

13353 La théorie des origines développementales de la santé (DOHaD) suggère que l'environnement maternel durant la vie fœtale a un impact sur la santé lors de vie future. Nos recherches s'intéressent aux modifications de l'environnement gestationnel, et plus particulièrement à l'impact des polluants,

durant cette période, et ces effets sur le métabolisme de la descendance. De précédentes études menées au sein de notre laboratoire ont mis en évidence que l'exposition de la rate gestante à un mélange de contaminants environnementaux avait un impact sur le métabolisme du glucose et le fonctionnement mitochondrial de la descendance. D'autres ont montré que l'entraînement physique de la rate gestante modifiait la composition corporelle et le métabolisme énergétique de la descendance.

Dans la continuité de ces projets, nous souhaiterions voir si l'exercice maternel pratiqué avant et durant la gestation permet de limiter les effets d'une exposition à des polluants, durant la grossesse, sur la descendance. De plus l'hypothèse centrale de notre programme de recherche est que des profils métaboliques spécifiques reprogramment directement la mémoire épigénétique. Notre étude est multigénérationnelle (4 générations), seule la génération F0 sera entraînée et/ou exposée aux polluants. Nous pourrons ainsi, chez les générations F1 et F3, étudier l'héritage épigénétique dans des conditions contrôlées.

Ces travaux pourraient contribuer à affiner les recommandations en termes d'exposition aux polluants mais également d'activité physique chez la femme sportive ou active, enceinte et allaitante, comme le recommande l'OMS, en vue de l'optimisation de la santé de la descendance.

Ce projet sera réalisé dans le respect du principe des 3R. Nous utiliserons un modèle murin de rat Wistar qui correspond à l'espèce la plus pertinente et la moins susceptible de ressentir de la douleur, de la souffrance ou de l'angoisse de façon durable et sans qu'il soit possible de la soulager. Aucun modèle *in vitro* ne permet d'atteindre les objectifs fixés notamment avoir une vision intégrée des conséquences de l'exposition aux polluants (voie d'entrée digestive essentiellement) et de l'entraînement (modification de la dépense énergétique) sur différents index ou marqueurs physiologiques et métaboliques. Le rat est un modèle approprié et bien validé pour ce genre d'étude.

1915 animaux seront nécessaires à ce projet qui durera 5 ans. Nous prendrons le soin d'utiliser le nombre minimal d'animaux mais qui permet cependant de tirer des conclusions statistiques significatives. Le nombre d'animaux par groupe a été estimé sur la base d'études publiées, qui utilisent le même modèle (entre 6 et 12/gp selon les dosages). Les expériences ont été soigneusement planifiées (par rapport aux données bibliographiques et à nos résultats préalables) pour permettre la collecte d'un maximum d'informations à partir des individus étudiés. De plus, les organes non utilisés seront congelés pour des études complémentaires éventuelles.

Notre animalerie est un établissement utilisateur agréé où nous maîtrisons parfaitement l'exposition aux contaminants environnementaux qui nous intéressent et où le bien-être des animaux est notre priorité (utilisation pour cela de biberons en Polyphénylsulfone, cages en Polysulfone, nourriture semi purifiée, litière de peuplier, contaminants "controlés" concernés : Triclosan, Méthylparaben, Bisphénol S(BPS), enrichissement du milieu). Tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux.

Après deux semaines d'acclimatation, les animaux F-1 seront accouplés pour obtenir notre génération F0 qui sera la seule à être exposée aux contaminants (16 semaines d'exposition, mâles et femelles, mélange de Triclosan, Méthylparaben, Bisphénol S(BPS) à 2 concentrations différentes qui restent dans les limites des concentrations d'expositions trouvées chez l'humain) et/ou à être entraînée avant et pendant la gestation (femelles seulement). Nous obtiendrons ainsi 6 groupes d'animaux. Les générations d'après F1, F2 et F3 seront élevées sous une diète semi purifiée, sans contaminants et ne seront pas entraînées.

Un ensemble de gestes techniques seront effectués sur nos animaux. Ce projet ne fait appel qu'à des procédures expérimentales légères (ou sans réveil, guillotine et prélèvement de tissu) n'entraînant pas de douleur chez l'animal ou une douleur légère et très brève.

Nous réaliserons ainsi des tests de tolérance au glucose et à l'insuline sur animaux éveillés et sans euthanasie dans lesquels du glucose (1g/kg/MC) ou de l'insuline (1 mUI/g/MC) seront injectés aux animaux par voie intrapéritonéale. Nous préleverons les urines des animaux sur 24 heures, nous effectuerons des prélèvements sanguins au bout de la queue des animaux (60µl) 2 fois au cours de la gestation pour doser la glycémie. Nous récolterons également durant la grossesse, à 14 jours de gestation, les urines et à 19 jours de lactation le lait des mères (sous anesthésie) pour mesurer

les quantités de polluants présents dans l'organisme. Nous effectuerons également des tests de comportement ainsi que des IRM (sous anesthésie) du cerveau.

Ce projet ne fait appel qu'à des procédures expérimentales légères (ou sans réveil, guillotine ou surdose de doléthal et prélèvement de tissu) n'entraînant pas de douleur chez l'animal ou une douleur ou une contrainte légère et très brève.

C'est aussi le cas pour l'entraînement physique. Ce type de test est un modèle exposant l'animal à des stimuli désagréables qui sont brièvement associés à une douleur, une souffrance ou une angoisse légère et auxquels l'animal est en mesure d'échapper en courant. Les animaux sont néanmoins surveillés tous les jours et tout signe de blessure ou de détresse conduira à l'euthanasie immédiate des animaux concernés. Pour cela nous suivons très précisément l'état général des animaux, leur poids ainsi que leur prise alimentaire (2 fois par semaine tout au long du protocole). S'il s'avérait que l'un d'entre eux perde du poids de façon importante (15% au cours d'une semaine) il serait euthanasié.

13354 Les pathologies cérébrales regroupent, entre autres, les maladies neurodégénératives et les traumatismes. Chaque année, les troubles neurologiques affectent près d'un milliard de personnes dans le monde, et 50 millions d'individus sont blessés ou deviennent invalides suite à un traumatisme. C'est pourquoi le traitement de ces pathologies est un enjeu majeur de santé publique.

Le projet a pour finalité le traitement par thérapie génique d'une maladie neurodégénérative, la leucodystrophie métachromatique, due à un déficit d'une enzyme appelée arylsulfatase A. Cette maladie débute dans l'enfance et entraîne une accumulation de sulfatides dans le cerveau et les reins qui conduisent très rapidement à une démyélinisation du système nerveux et au décès dans les cinq ans après le début des symptômes. Notre stratégie thérapeutique à long terme, consistera à introduire du matériel génétique (plasmide) codant pour l'arylsulfatase A dans les cellules du système nerveux pour soigner la maladie. Cette approche nécessite l'utilisation d'un transporteur (vecteur) qui permet la protection contre la dégradation, et l'acheminement du plasmide vers l'organe cible. Dans cette optique, nous avons développé plusieurs vecteurs innovants et les avons pré-sélectionnés *in vitro* sur des cellules en culture. Ces études préliminaires *in vitro* ont permis de montrer d'autre part que l'encapsulation de nos plasmides présentent des avantages supérieurs en terme de biosécurité et d'efficacité de transfection par comparaison à ceux utilisés classiquement en thérapie génique. L'objectif de cette étude est double 1) évaluer l'efficacité des plasmides (expression) et 2) déterminer leur répartition dans les différents organes (biodistribution) lorsqu'ils sont acheminés par ces vecteurs originaux.

Le projet est prévu pour 5 ans et nécessitera 120 souris. Le modèle *in vivo* ne peut être remplacé par une méthode alternative. Dans une première étude, les souris recevront une injection unique de formulation (vecteur + plasmide), par voie intraveineuse, sous anesthésie locale. L'expression des plasmides sera visualisée en temps réel par imagerie de la bioluminescence émise par les plasmides (production de lumière) sous anesthésie générale. L'analyse dure 10 minutes au maximum. Après 20 jours suivant l'injection, les souris seront anesthésiées et euthanasiées. Leurs organes seront collectés pour quantifier l'expression du gène modèle de manière plus précise. Dans une deuxième étude, les souris recevront une injection unique de formulation (vecteur + plasmide marqué), par voie intraveineuse, après anesthésie locale. Les plasmides étant marqués, ils seront détectables par imagerie de fluorescence. A des temps déterminés, les souris seront donc anesthésiées et placées dans le système d'imagerie pour une durée de 3 minutes au maximum pour localiser les molécules injectées. A 6h après l'injection, les souris seront euthanasiées. Leurs organes seront collectés pour quantifier la biodistribution des vecteurs.

Dans un souci de se conformer à la règle des 3 R, nous utiliserons l'imagerie optique non invasive et non traumatisante, pour évaluer le profil de distribution et d'expression des plasmides en fonction du temps réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés au minimum. En effet, il ne sera plus nécessaire de sacrifier l'animal pour localiser et visualiser l'expression des plasmides puisque ceci pourra être évalué en fonction du temps, grâce à l'utilisation de l'imagerie.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes. Des études préalables ont permis de sélectionner le plasmide le plus efficace, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés.

La souffrance des souris sera réduite au maximum. Les procédures invasives ou d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale ou locale. Une grille d'évaluation de la douleur a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence, son comportement, révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera la mise à mort anticipée de l'animal.

Ainsi, grâce à ces études, nous pourrions valider l'efficacité et la distribution d'une formulation délivrant de manière efficace des plasmides vers le cerveau ouvrant de nouvelles perspectives pour les pathologies cérébrales.

13355 Les staphylocoques, sont des bactéries largement répandues dans l'environnement ainsi qu'au niveau des organismes vivants. Chez l'homme et l'animal sains, ils vivent à la surface de la peau et des muqueuses et font partie de la flore appelée commensale. Dans certains cas de baisse des défenses de l'organisme ou de rupture des barrières de protection naturelles, ils peuvent causer des infections locales superficielles ou profondes (abcès) voire diffuser et infecter d'autres organes. Un type particulier, le *Staphylococcus aureus*, communément désigné staphylocoque doré, est plutôt considéré comme agent pathogène mais certains sujets sains en sont porteurs sans développer d'infections on parle alors de colonisation.

Le portage nasal à *Staphylococcus aureus* concerne 20-30% de la population générale non malade et constitue un facteur de risque d'infections en particulier chez les patients opérés de chirurgie cardio-vasculaire et orthopédique surtout car il peut passer de la surface des muqueuses à des tissus profonds à l'occasion de la chirurgie. Pour éviter cela, la décontamination nasale (DN) a démontré un effet bénéfique. Il s'agit d'appliquer dans les narines un ou des agents antibiotiques. En tant qu'antibiotique, la mupirocine est la molécule de choix pour la DN mais des germes résistants commencent à émerger justifiant le besoin de nouvelles molécules.

Le but de ce projet est de tester chez la souris la tolérance et l'efficacité d'une famille de molécules (M) (5 molécules) en cours de développement au sein de notre institution en comparaison avec 2 antibiotiques largement utilisés en clinique : la Vancomycine et la mupirocine. Un autre but serait de tester la biodisponibilité des molécules chez les rats par différentes voies d'administration.

- Dans un premier temps nous testerons la tolérance de nos molécules appliquées sur la peau des souris sous forme de gel ou de pommade vaselinée.
- Dans un second temps nous testerons l'efficacité des molécules à réduire le nombre de bactéries sur la peau dans un modèle de colonisation cutanée par *Staphylococcus aureus*. Pour ce faire, nous utiliserons des souris Balb/c femelles. La colonisation sera effectuée par simple dépôt d'une solution infectante contenant *Staphylococcus aureus* sur une zone rasée du dos de l'animal. L'application de la préparation antibiotique sera effectuée 1 h après le rasage par simple dépôt. Le rasage sera effectué sous anesthésie.
- Dans un troisième temps, nous testerons chez les rats la proportion de molécule qui atteint la circulation générale (biodisponibilité) après administration par voie sous-cutanée et par voie topique en comparaison à la voie intraveineuse. Cette étude nous permettra de prédire le profil d'absorption des molécules par les différentes voies d'administration.

Ce protocole tient compte des recommandations de raffinement car basé sur des publications antérieures ayant montré l'innocuité de ce type d'infection qui ne provoque pas d'abcès, pas de rougeur, pas d'inconfort et aucun décès des souris. Le simple dépôt des bactéries et des antibiotiques à la surface permet d'éviter les injections. Les prélèvements par écouvillonnage de surface sont des procédures non invasives. Il n'est pas attendu de douleur après cette procédure ni dans les heures ou jours qui suivront.

L'administration par voie topique chez les rats n'est pas douloureuse et ne provoque pas d'inconfort aux animaux. Le volume d'administration par voie intraveineuse et sous-cutanée sera le plus bas

possible afin de réduire le temps d'injection. Un anesthésique local sera appliqué pour réduire la douleur.

Les animaux seront mis 5 par cage avec un enrichissement et de la nourriture et de l'eau ad libitum.

Pour réduire le nombre d'animaux dans l'étude d'efficacité chez les souris, des études préliminaires *in vitro* visant à déterminer la dose minimale efficace nous ont permis de cibler d'emblée la concentration d'antibiotique adéquate à tester, ce qui a permis de remplacer les tests de concentration *in vivo*.

Pour réduire le nombre d'animaux dans l'étude de biodisponibilité nous avons limité les administrations aux voies intraveineuse, sous-cutanée et topique et donc réduit le nombre total d'animaux.

Pour l'étude d'efficacité 80 souris seront nécessaires pour chaque molécule, y compris les quelques animaux utilisés pour la mise au point. Sachant que 5 molécules seront évaluées dans les 5 prochaines années, nous élevons le nombre total à 400 souris.

Pour l'étude de biodisponibilité, 75 rats seront nécessaires pour tester 5 doses différentes d'une molécule (5 doses, 3 voies d'administration, 5 rats par groupe). Sachant que 5 molécules seront évaluées dans les 5 prochaines années, nous élevons le nombre total à 375 rats.

13356 La plupart des médicaments qui réduisent l'inflammation contribuent au contrôle de la douleur mais s'avèrent inefficaces lorsque les phénomènes de sensibilisation prolongée à la douleur sont installés. Nous cherchons dans la partie clinique de l'étude d'une part à tester les effets antidouleur d'un médicament anti-inflammatoire particulier, le Tofacitinib, chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (RA). Et d'autre part à identifier des biomarqueurs permettant de prédire l'efficacité d'action du Tofacitinib afin de réduire les prescriptions inutiles. L'objectif spécifique du projet préclinique, qui nous concerne ici, est de confirmer l'action spécifique du Tofacitinib sur les circuits neuronaux de la douleur chez des modèles animaux, et d'identifier les biomarqueurs associés à cette action neuronale. Il s'agit d'un projet multidisciplinaire mettant à contribution des équipes, chargées de réaliser des études cliniques sur patients RA, et une équipe de neuroscience responsable des études précliniques.

L'étude sera menée sur des modèles inflammatoires chez la souris après administration par voie orale de Tofacitinib. Tous les contrôles adéquats seront réalisés. Nous utiliserons deux séries de souris. (1) Nous étudierons d'abord les effets du Tofacitinib sur le comportement douloureux par la mesure de réflexes d'évitement. Ce premier travail permettra de définir la fenêtre d'action du Tofacitinib. Sur cette même série, nous effectuerons des prélèvements du tissu nerveux de manière à détecter l'expression de biomarqueurs spécifiques. Le niveau d'expression de ces biomarqueurs sera corrélé à l'efficacité du Tofacitinib de manière à pouvoir prédire ultérieurement, chez des patients RA, l'efficacité attendue d'un traitement au Tofacitinib. (2) Nous caractériserons ensuite par électrophysiologie, pendant la période d'efficacité maximale du Tofacitinib, l'activité fonctionnelle des neurones de la moelle épinière.

Ce projet respecte la règle des 3R. Ainsi, pour le R de Raffiner, tous les protocoles sont réalisés par des experts dans le domaine et sont ainsi optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie gazeuse comme indiqué lors des procédures et un antalgique sera administré avant et après chirurgie pour éviter les douleurs post-chirurgicales. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur avec une surveillance renforcée après la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérimentation avec la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement et des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux.

Pour le R de Remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale et aucun modèle *in vitro* ne peut reproduire les conditions de la pathologie étudiée.

La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique qui tient compte de l'hétérogénéité inter-individuelle. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux sera de 10 ou 15 animaux par groupe.

La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite au total l'utilisation de 200 souris de type C57Bl/6J.

13357 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années une meilleure prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres centraux chroniques tels que : épilepsie, dépression, démence progressive...À ce jour, aucun traitement n'est proposé pour limiter le risque de mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Le projet s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires des conséquences chroniques d'un traumatisme crânien dans le but de développer des approches thérapeutiques efficaces.

L'originalité de l'étude proposée joue sur la globalité, c'est-à-dire : i) appréhender les changements qui se mettent graduellement en place au sein de l'unité neurovasculaire par recherche de perturbations du débit sanguin cérébrale et de modifications de la structure de la barrière hémato-encéphalique. Nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle déjà approuvé de traumatisme crânien chez la jeune souris, peu invasif. Nous disposons d'outils d'imagerie dédiés au petit animal de dernière génération : écho doppler photoacoustique. Ils permettront d'étudier et de suivre les processus de dégénérescence du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme. Nous possédons déjà une bonne expertise en clinique et en recherche sur les pathologies cérébrovasculaires associées aux dysfonctionnements neuronaux. Nous utiliserons 72 animaux au total pour ce projet.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

Remplacer : L'étude proposée à partir d'un modèle de traumatisme crânien chez la souris ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau intégré d'informations.

Réduire : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Les protocoles choisis, de classes légères à modérées, déjà utilisés en routine, n'induisent pas de morbidité. Le suivi longitudinal non invasif réalisé en imageries permet de réduire le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet. :

Raffiner : le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique et de recherche formé et qualifié. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Nous y veillerons par observation quotidienne. Tous les protocoles s'effectueront sur l'animal anesthésié. Les chirurgies seront effectuées en conditions d'asepsie, avec maintien de la température corporelle, une analgésie post-opératoire sera délivrée. En cas de complications infectieuses, une prophylaxie par antibiotiques sera mise en place.

13358 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire fréquente responsable de destructions articulaires et d'une mortalité accrue. Cette pathologie est liée à une augmentation de cellules immunitaires pro-inflammatoires et un défaut de cellules anti-inflammatoires. Elle survient généralement sur un terrain génétique favorable en présence de facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs, l'alimentation et la flore intestinale semblent jouer un rôle important, en modifiant le métabolisme cellulaire. L'objectif de ce projet est de rétablir la balance cellules pro/anti-inflammatoires en agissant sur les sources énergétiques des cellules immunitaires, soit en utilisant des médicaments agissant leur métabolisme, soit en modifiant l'alimentation ou la flore intestinale.

Pour moduler la balance cellules pro/anti-inflammatoires, nous testerons d'abord *in vitro* des médicaments modulant le métabolisme, différents nutriments et bactéries de la flore intestinale. Les expériences *in vitro* sur des cellules de patients REMPLACERONT certaines expériences animales qui seront ainsi limitées aux approches les plus prometteuses. Deux modèles murins de polyarthrite rhumatoïde pourront alors être utilisés : un modèle aigu et un modèle chronique. En fonction de l'intervention testée, ces modèles seront induits soit chez des souris conventionnelles, soit chez des souris dont la flore intestinale aura été humanisée par transfert de celle de patients atteints de PR. Nous prévoyons de tester pour chacun des deux modèles murins : 4 médicaments modulant le métabolisme, 5 régimes alimentaires et 12 interventions sur la flore intestinale (« probiotiques »). Nous prévoyons de confirmer les mécanismes impliqués par des expériences de transfert de cellules pour les 3 approches les plus prometteuses. Pour les expériences murines portant sur les 4 médicaments modulant le métabolisme, 50 souris conventionnelles seront utilisées (20 contrôles et 30 arthrites) par intervention soit 200 au total. Pour les 5 régimes, 50 souris avec flore intestinale humanisée seront utilisées par intervention soit 250 au total. Pour les 12 interventions sur la flore intestinale, nous limiterons les expériences aux 30 souris arthritiques par intervention soit 360 au total. Pour les 3 transferts cellulaires, 40 animaux seront nécessaires par intervention soit 120 au total. Ainsi, le nombre de souris estimé pour ce projet est de 930 souris par modèle d'arthrite soit un nombre maximal de 1860 souris sur 5 ans. Ce nombre a été calculé et REDUIT au minimum nécessaire pour répondre statistiquement à la question posée (risque $\alpha=5\%$ et $1-\beta=80\%$) en prenant en compte l'incidence de l'arthrite expérimentale (70%).

Dans l'ensemble de nos expériences, les cages des souris seront enrichies d'abris et de cubes de bois et le fond sonore sera contrôlé. L'évolution de la maladie sera suivie 3 fois par semaine et la douleur provoquée par l'arthrite sera évaluée de façon quotidienne. Les souris seront sacrifiées si les points limites sont atteints. Elles seront sacrifiées à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation et les cellules du système immunitaire, l'intestin et les articulations seront récupérées en post-mortem.

13359 Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des hémopathies malignes agressives au pronostic réservé notamment en cas de rechute. Elles représentent 15 à 30% des leucémies aiguës de l'enfant et de l'adulte.

Les polychimiothérapies récentes ont permis d'améliorer le pronostic des leucémies aiguës, cependant 20 à 30% des patients atteints de LAL-T présentent une rechute le plus souvent réfractaire aux thérapeutiques conventionnelles et conduisant au décès des patients dans 60% des cas. Le statut mutationnel du gène NOTCH-1 (50% de mutations dans les LAL-T) semble être un facteur important de ces rechutes résistantes aux thérapies. Identifier les mécanismes à l'origine de la rechute et l'acquisition d'une chimiorésistance est essentiel pour améliorer le pronostic de ces patients.

Pour mener à bien ces objectifs il est dès lors indispensable d'évaluer leur impact dans des modèles vivants, seuls garants d'une reproductibilité dans ce contexte de pathologie maligne où le micro environnement joue un rôle décisif. Dans cette perspective la souris NSG constitue le modèle animal le plus adapté. Par ailleurs, les cellules leucémiques de patients sont fragiles et ne peuvent être maintenues suffisamment longtemps *in vitro* pour y mener des tests thérapeutiques. Il est en revanche largement décrit dans la littérature scientifique que la souris est un bon modèle d'expansion des cellules leucémiques humaines.

Nous allons dans un premier temps injecter des leucémies de patients (NOTCH-1 muté ou non muté) à des souris immunodéficientes (NSG). Dans un deuxième temps ces souris seront traitées par de la chimiothérapie utilisée en routine clinique et bien tolérées par la souris. A l'issue du traitement nous trierons les cellules résiduelles ayant résisté à la chimiothérapie et nous chercherons à comprendre les mécanismes moléculaires en lien avec l'acquisition d'une chimiorésistance.

Les souris NSG seront particulièrement surveillées lors de ces procédures. Nous serons notamment attentifs au bien-être de ces animaux. Ainsi, afin de ne pas causer de souffrance, les injections de

cellules leucémiques humaines seront faites sous anesthésie générale. Durant les procédures expérimentales, un suivi quotidien des animaux sera mis en place afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes évocateurs d'une douleur animale qui motiverait une interruption de traitement. Si cela était justifié, la mise à mort de l'animal pourrait également être anticipée.

Le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet est évalué à 450 souris sur 5 ans. Pour réduire ce nombre, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

13360 La connaissance de la digestibilité des aliments et des matières premières par le poulet en croissance est un préalable nécessaire à la formulation d'aliments adaptés. Afin de couvrir au mieux les besoins nutritionnels des poulets et de leur proposer des aliments équilibrés, il est important d'évaluer leur propre façon de digérer les aliments consommés, autrement dit, d'établir les coefficients de digestibilité des différents nutriments (protéine, matière grasse, acides aminés, énergie).

Le passage par une étude *in vivo* est indispensable car aujourd'hui aucune méthode *in vitro* ne permet d'acquérir ces connaissances.

La méthode utilisée pour les mesures de digestibilités consiste à faire le lien entre la quantité de nutriments ingérée et la quantité de nutriments, soit excrétée dans les fientes, soit retrouvée en dernière partie du tube digestif, juste avant les ceca. Dans le premier cas, il s'agit de la digestibilité fécale. Elle est utilisée pour l'énergie, la matière organique et la matière grasse. La collecte des fientes peut être totale (nécessitant une mise à jeun préalable) ou partielle (sans mise à jeun, mais nécessitant la présence d'un marqueur alimentaire). Dans le second cas, on parle de digestibilité iléale ; celle-ci est utilisée pour les protéines et les acides aminés.

Dans les deux cas, les poulets sont tout d'abord élevés en groupe au sol durant les 14 premiers jours où ils reçoivent un aliment adapté à leurs besoins. Puis ils sont placés en logements individuels pour une durée maximale de 11 jours : 3 jours d'adaptation et au maximum 8 jours nécessaires aux mesures et prélèvements. Ces derniers se font par récolte des fientes sous les logements pour les mesures de digestibilités fécales et post-mortem dans le cas des mesures de digestibilités iléales.

La mise en logements individuels est nécessaire afin de pouvoir isoler et récolter les fientes de façon individuelle. Un enrichissement est réalisé par la suspension de ficelles avec un nœud. Les poulets ont la possibilité de se voir, de s'entendre et d'émettre des vocalises.

L'évaluation d'un mélange alimentaire nécessite 18 poulets.

Selon le cas, les pertes digestives endogènes (excrétion azotée non attribuable à l'aliment) des poulets peuvent être évaluées simultanément ; elles concernent 18 poulets. Ils reçoivent un régime dépourvu de protéine sur une durée limitée à 4 jours et leurs excréta sont collectés.

Le nombre d'animaux a été défini comme étant le nombre minimal permettant d'obtenir des données fiables et une quantité de fiente suffisante pour les analyses chimiques.

Chaque période d'évaluation implique 144 poulets.

En 1 an, 3 périodes d'évaluation sont réalisées, soit 432 poulets au total. Sur la durée du projet, qui est de 5 ans, le nombre de poulets est de 2160.

13361 Le cancer colorectal reste toujours la troisième cause de décès par cancer dans le monde malgré tous les progrès réalisés ces dernières années. Détecté à un stade précoce, il est de bon pronostic avec environ 90% de guérisons, mais lorsqu'il est découvert tardivement et qu'il présente des métastases, les chances de survie sont très faibles. Il est important de trouver de nouvelles stratégies pour améliorer l'efficacité des thérapies utilisées en clinique. L'oncogène Src joue un rôle important dans la formation de cancer colorectal (CCR), cependant les médicaments bloquant son activité sont peu efficaces. De manière intéressante, nous avons identifié une nouvelle région de cet oncogène qui est impliquée dans son activité tumorale. L'inactivation de cette région réduit l'activité oncogénique de Src dans les cellules de CCR en culture. Notre objectif est donc maintenant de valider ces résultats *in vivo* en réalisant un modèle murin basé sur des greffes de tumeurs. A

terme, ces résultats pourraient permettre de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur des molécules interférant avec cette région de Src pour bloquer plus efficacement son activité tumorale dans le CCR.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante (réduire). Des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues comme le suivi régulier des animaux, l'injection d'analgésiques en cas de douleur, l'application des points limites (sang dans les fèces, prostration, pattes blanches) et enrichissement des cages avec de la sciure de peuplier, copeaux et briques de peuplier (raffinement). Enfin, pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre limité de 144 souris sur une durée de 4 ans car de nombreuses expériences ont été réalisées *in vitro* pour éviter au plus l'utilisation d'animaux (remplacement).

13362 Le traitement des douleurs chroniques reste un problème de santé majeur. Les antalgiques de référence, comme la morphine, souffrent d'un ratio bénéfice/risque limité. De plus, ces médicaments sont souvent inefficaces pour traiter les douleurs chroniques et les troubles graves de l'humeur associés à leur apparition, comme l'anxiété et la dépression. Ces comorbidités alourdissent le fardeau des douleurs chroniques, réduisant drastiquement la qualité de vie des patients et rendant le traitement de l'une ou l'autre pathologie plus difficile.

Malgré la reconnaissance par les cliniciens du lien entre dépression et douleurs, on connaît très peu de choses sur les mécanismes neuronaux reliant ces deux pathologies, empêchant le développement de stratégie thérapeutique efficace pour traiter ces douleurs et leurs comorbidités. Certaines observations peuvent cependant nous donner une indication sur le chemin à suivre : la chronicisation d'une douleur peut entraîner une incapacité à ressentir une émotion positive lors de situations de vie pourtant être considérées antérieurement comme plaisantes. Ce syndrome, appelé anhédonie, serait ensuite responsable de l'apparition de troubles de l'humeur, comme la dépression.

Mais quels sont les mécanismes neuronaux et moléculaires pathologiques reliant la douleur et l'anhédonie ? Pour répondre à cette question il nous faut tout d'abord comprendre comment une expérience positive émerge du système somatosensoriel, et ensuite observer comment cette même expérience est traitée par les mêmes réseaux neuronaux en condition de douleur chronique pour proposer des alternatives thérapeutiques.

La première partie de ce projet consiste tout d'abord à identifier les réseaux neuronaux impliqués dans la perception d'une expérience tactile plaisante. La deuxième partie consiste, quant à elle, à observer, identifier et inverser les changements induits dans ces réseaux neuronaux pouvant être la cause des états dépressifs et anxieux induits par les douleurs chroniques.

Notre projet pour 5 ans nécessite 400 souris issues de plusieurs lignées spécifiques.

Nous avons choisi de travailler sur la souris car le toucher plaisant et les douleurs chroniques anormales se modélisent chez cet animal, ce qui permet d'étudier en profondeur les circuits neuronaux qui sont engagés, et d'étudier les causes moléculaires et cellulaires des dysfonctionnements cognitifs liés à la douleur afin de proposer et valider de nouvelles cibles thérapeutiques.

Notre démarche est conforme à la règle des 3R et aux recommandations sur l'éthique de l'expérimentation animale de la douleur.

Remplacement : Le recours à l'expérimentation animale est indispensable car 1) le toucher plaisant la douleur est une sensation qui ne peut être quantifiée que chez l'être conscient ; 2) il n'existe pas de modèles *in vitro* ou de modèles mathématiques permettant de modéliser la représentation du toucher et de la douleur au niveau du cortex insulaire. La variété des techniques de modifications génétiques chez la souris permet d'identifier et de cibler spécifiquement des mécanismes neuronaux, moléculaires ou cellulaires. L'expérimentation humaine n'atteint pas ce niveau de résolution. Nous considérons donc le recours à la souris comme guidé par des considérations scientifiques, techniques et éthiques.

Réduire : Chez l'homme, la dimension émotionnelle de la douleur est un paramètre confondant, qui rend difficile la constitution de petites cohortes homogènes. A l'inverse, les modèles animaux sont homogènes et fournissent des résultats reproductibles. Ceci permet d'établir avec précision le nombre d'animaux nécessaire à la validation des hypothèses de travaux par des tests de puissance statistique. Nous exploitons au mieux nos élevages, puisque nous étudions mâles et femelles, et que nous étudions la majorité des génotypes produits.

Raffinement : Lors de ce projet nous cherchons à déterminer des seuils de perceptions des stimuli tactiles, et pas plus. De plus, l'utilisation de souris génétiquement modifiées qui présentent des propriétés bien calibrées, permet d'augmenter la précision des résultats et la portée des conclusions. Enfin toutes les douleurs post opératoires sont prise en compte.

13363 L'évolution des soins parentaux est un axe majeur de la recherche écologie évolutive. Les soins parentaux ont été largement étudiés chez les oiseaux et les mammifères. D'autres groupes comme les amphibiens fournissent de nombreux exemples de comportements parentaux. Le crapaud accoucheur présente un mode de reproduction spécifique avec une ponte hors du milieu aquatique et un transport des œufs sur le dos du mâle pendant le développement embryonnaire. Ce modèle est donc très pertinent pour étudier les contraintes et bénéfices associés aux soins parentaux. Les amphibiens sont exposés à un déclin global et il est important de connaître leur écologie.

L'objectif principal du projet est de mesurer l'influence de la reproduction (transport des œufs) sur l'écophysiologie des mâles. Les animaux seront étudiés sur le terrain en conditions naturelles et de façon transitoire (4 jours) en captivité. Tous les animaux seront ensuite relâchés au lieu exact de capture.

La reproduction chez cette espèce s'étale de Mars à Août et nous étudierons les effets du statut reproducteur (reproducteur ou non), du stade de reproduction et de la saisonnalité. L'effectif maximum prévu est de 180 individus et la collecte des données sera réalisée sur 2 ans. Les mâles reproducteurs et non reproducteurs seront capturés sur le terrain et des prises de sang seront réalisées pour étudier les taux hormonaux à la capture (état de base), puis 1 heure plus tard (réponse au stress). Une partie des individus sera ramenée en captivité pour mesurer des paramètres comportementaux simples : préférences thermiques et locomotion. L'ensemble des procédures sera réalisé sur trois jours.

La règle des trois R a été prise en compte de la façon suivante :

- Remplacement : l'étude concerne spécifiquement le mode de reproduction de cette espèce en conditions naturelles. Il n'est pas possible de remplacer les crapauds vivants par d'autres processus ni par des individus captifs.
- Réduction : Le nombre d'individus sera réduit au minimum (10 par groupe) pour permettre de détecter des différences hormonales significatives. Seule une fraction sera placée en captivité temporaire (5 par groupes). Les animaux seront marqués afin d'éviter tout prélèvement rapproché. Un délai de 2 semaines sera respecté entre prises si le statut reproducteur change.
- Raffinement : il sera réalisé en limitant la durée de manipulation au minimum et en limitant la quantité de sang prélevée à 20 microlitres par prise. Le temps de séjour en captivité sera court avec des conditions d'hébergement optimisées.

13364 Le cortex cérébral est crucial pour de nombreuses fonctions qui sont assurées par des aires spécifiques (motrice, visuelle, ...). Le cortex adulte n'est pas capable de générer de nouveaux neurones. Pour remplacer les neurones corticaux perdus, une stratégie potentielle est de générer des neurones *in vitro* à partir de cellules souches embryonnaires (ESC), puis de les greffer dans la zone lésée. Les ESC parthénogénétiques (Pg-ESCs) sont des ESC particulières qui possèdent un double patrimoine génétique maternel, ce qui limite la probabilité de rejet. Ces Pg-ESCs sont un outil prometteur pour la thérapie cellulaire de nombreux organes, mais leur potentiel thérapeutique pour le cortex n'a pas été défini. D'autre part, actuellement seul le cortex visuel est généré depuis les ESCs, alors qu'il serait autant intéressant de régénérer du cortex moteur, qui est ciblé par des maladies génétiques comme la sclérose latérale amyotrophique. Nous avons généré

du cortex *in vitro* à partir de Pg-ESCs et également dans des chimères embryonnaires. D'autre part, nous avons mis au point un protocole pour générer du cortex de type moteur *in vitro*. Nous souhaitons désormais définir si les neurones issus soient de Pg-ESCs, soit d'ESC WT soumises au protocole de 'motorisation' peuvent s'intégrer dans le cortex lésé de souris adulte. Ceci supporterait fortement leur potentiel thérapeutique. En collaboration avec une équipe experte en greffes corticales nous avons défini un protocole de lésion par aspiration suivi par injection de dérivés corticaux des cellules ESC murines au site de lésion. Trois semaines plus tard, les souris sont sacrifiées et le bénéfice de la greffe est estimé par immunomarquage. Dans la mesure où la greffe est techniquement difficile, et puisque nous devons aussi utiliser des cellules contrôles qui ont précédemment marché pour ce type d'expérience (ESC Tau-GFP) et des cellules contrôle WT pour les Pg-ESC, nous estimons que nous aurons besoin de 70 souris C57B6 âgés de 4 à 6 mois pour de greffes dans le cortex lésé adulte (pour tester les Pg et la motorisation) et de 40 animaux nouveaux nés pour tester si le cortex généré *in vitro* est de type moteur comme le suggèrent les expériences *in vitro*. La règle des 3R sera appliquée ainsi: Remplacer: des méthodes *in vitro* basées sur la culture cellulaire ont été utilisées pour toute la caractérisation initiale des cellules. Réduire : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux autant que possible. Notamment, certains animaux seront injectés à la fois dans les cortex moteur et visuel: i) efficacité de la greffe ; ii) nature moléculaire du greffon ; iii) cartographie fine des projections axonales du greffon par analyse immunohistochimique. Raffiner: Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales, avec soin particulier au suivi post-opératoire. Cette étude nous permettra de proposer deux nouveaux outils thérapeutiques potentiels pour le traitement de pathologies invalidantes.

13365 L'allergie alimentaire constitue un problème majeur de santé publique du fait de sa prévalence et de la gravité des symptômes qu'elle engendre. Les mécanismes immunitaires conduisant à la sensibilisation et à l'allergie sont encore mal connus bien qu'il semble que la peau pourrait être une voie de sensibilisation. Cependant, la voie cutanée est également impliquée dans l'induction de tolérance.

Dans ce cadre, nous souhaitons étudier les mécanismes immunitaires au niveau de la peau et des organes immunitaires associés (ganglions) impliqués dans ces phénomènes de sensibilisation et/ou de désensibilisation afin de les comprendre et de pouvoir possiblement intervenir dessus.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser, sur une période de 5 ans, 16610 souris âgées de 5 semaines. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier cartonné permettant la nidification, maisonnette, musique). Aucun test *in vitro* (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie.

13366 Il existe au sein du cœur un certain nombre de circuits neuronaux assurant la modulation de la fonction cardiaque. De récentes découvertes supportent le concept qu'un remodelage de ces structures, suite à une atteinte cardiaque (infarctus, insuffisance cardiaque), conduirait à l'émergence de troubles du rythme. Pour autant, il n'existe encore que très peu d'études fonctionnelles portant sur les neurones intracardiaques. Une difficulté pour de telles études est de pouvoir cibler spécifiquement l'activité de certains neurones cardiaques pour comprendre leur rôle. L'objectif de ce projet est d'utiliser les techniques d'optogénétique afin de pouvoir étudier spécifiquement l'influence de ces neurones sur l'activité cardiaque. En effet, l'optogénétique est une technique qui permet, grâce à l'expression ciblée de protéines photosensibles dans les neurones, de stimuler ou d'inhiber leur activité grâce à des flashes de lumière. Ceci permettra de comprendre le rôle de ces neurones dans le fonctionnement normal et pathologique du cœur et permettra donc

d'évaluer leur importance en termes de futures cibles thérapeutiques. Les souris utilisées permettront une expression ciblée des outils optogénétiques dans les neurones sensoriels cardiaques.

L'étude de l'influence des neurones sensoriels sur les propriétés électriques et contractiles du cœur par stimulation lumineuse sera réalisée *ex vivo* après euthanasie de l'animal et prélèvement du cœur. Pour réaliser ces expériences, 240 souris B6 ; 129S-Calb1tm2. 1(cre)Hze/J seront utilisées.

La règle des 3R sera mise en application de la façon suivante:

Remplacement : il n'est pas possible de satisfaire au critère de Remplacement des animaux par d'autres préparations biologiques puisque l'objet de l'étude est justement de tester la commande *ex vivo* du cœur par la stimulation lumineuse des neurones sensoriels.

Réduction : Réduction au minimum du nombre d'animaux tout en gardant ce nombre suffisant pour obtenir des résultats significatifs.

Raffinement : à la fois des conditions d'hébergement des animaux (ambiance améliorée, par exemple diffusion à bas niveau de musique douce) et du protocole expérimental (par exemple surveillance renforcée avec une attention particulière aux signes pouvant indiquer une douleur de l'animal). Une surveillance et une observation quotidienne du comportement des animaux sont assurées et une pesée hebdomadaire permettra de s'assurer de la bonne santé des animaux durant l'ensemble du protocole.

13367 L'accident vasculaire transitoire (AIT) tout comme l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une atteinte neurologique soudaine due à l'occlusion d'un vaisseau sanguin cérébral. Bien qu'il ne conduise pas à une lésion cérébrale visible en imagerie par résonance magnétique (IRM), les patients peuvent rencontrer des difficultés qui affectent leur qualité de vie comme la fatigue et des déficits cognitifs comme l'anxiété et la dépression.

Le premier objectif sera donc de déterminer s'il existe des perturbations dans le système nerveux central suite à un AIT, particulièrement dans le couplage neurovasculaire. Ce phénomène correspond à l'intervention de plusieurs types cellulaires du parenchyme cérébral et des artères et capillaires sanguin qui ont pour objectif de subvenir aux besoins énergétiques des neurones grâce à une adaptation locale du débit sanguin cérébral (DSC). Un mauvais fonctionnement de ce mécanisme pourrait engendrer des symptômes neurologiques.

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase découverte dans le système sanguin capable de convertir le plasminogène en plasmine, permettant ainsi de dégrader les caillots sanguins. Grâce à cette activité fibrinolytique, le tPA est actuellement le seul traitement pharmacologique des AVC de type ischémique. Il a été notamment décrit que le tPA pourrait moduler le couplage neurovasculaire de façon positive lorsque celui-ci est injecté par voie intraveineuse.

Le deuxième objectif sera d'observer si l'injection de tPA par voie intraveineuse permettra de rétablir le couplage neurovasculaire altéré par l'AIT.

L'hypertension artérielle (HTA) est connue comme étant l'un des facteurs altérant le couplage neurovasculaire, de plus l'HTA est l'un des facteurs de risques le plus important pour les AVC et AIT. Il est donc très intéressant d'étudier notamment cette altération du couplage dans un modèle de souris hypertendus et le potentiel rétablissement de ce couplage via l'injection de tPA par voie intraveineuse.

De plus, il serait très intéressant d'étudier le couplage neurovasculaire dans des modèles où le tPA endogène ne jouerait plus son rôle modulateur en condition pathologique. En effet, l'importance du tPA sera mieux comprise dans ces pathologies et si un traitement avec celui-ci améliore le couplage neurovasculaire.

Ces études basées sur l'expérimentation animale prennent en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans pour le couplage neurovasculaire mais aussi dans le domaine de l'ischémie cérébrale. L'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sont donc

parfaitement bien connues. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature rend cette espèce intéressante pour ce travail. Le modèle *in vivo* est donc indispensable afin de pouvoir étudier l'altération du couplage neurovasculaire dans les pathologies (AIT et HTA) et le potentiel rétablissement de ce couplage via le tPA.

Une étude de puissance statistique en amont, permet de nous assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité soit 700 souris. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés. Les animaux sont hébergés dans des cages standards enrichies (ouate pour nidification), dôme) aux normes européennes (type IV) suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

13368 Expliquer pourquoi certaines espèces sont envahissantes est une question fondamentale en biologie de l'invasion. Des recherches récentes suggèrent que la personnalité animale jouerait un rôle dans le succès d'invasion. Cependant, l'étude intégrée des traits qui constituent la personnalité a rarement été réalisée sur des espèces sauvages, d'autant plus dans un contexte d'invasion.

Le projet vise à identifier si la personnalité et son évolution en populations naturelles expliquent l'invasion en cours au Sénégal de la souris sauvage *Mus musculus domesticus*, arrivée d'Europe à l'époque coloniale. La souris est un bon modèle pour aborder cette question, du fait de solides connaissances comportementales acquises en laboratoire, de son histoire d'invasion bien caractérisée au Sénégal, et de ressources génétiques exceptionnelles.

Notre premier objectif est de tester si la personnalité des souris varie entre la zone anciennement colonisée et le front d'invasion actuel au Sénégal. Pour cela, nous échantillonnerons des souris sauvages dans six localités le long d'un gradient d'invasion. Nous caractériserons les personnalités des souris ($n = 210$) avec des tests comportementaux sur le terrain. Nous utiliserons comme congénère standard pour certains tests 10 souris Balb/c (provenance : Institut Pasteur de Dakar), maintenues en captivité sur le terrain. Toutes les souris utilisées seront euthanasiées en fin d'expérimentation. Les expérimentations du projet ont été définies en suivant la règle des 3 R: "Réduire" (limitation aux expériences indispensables ; limitation des effectifs ; limitation du nombre de test par animal) ; "Raffiner" (limitation du temps en captivité ; conditions de captivité éthiquement acceptables ; respect de temps de repos pour les animaux ; un test par jour par animal sauvage ; prélèvements intrusifs uniquement post-mortem, et donc pas de douleur attendue ; mesures visant à réduire le stress et l'angoisse dans les procédures expérimentales ; surveillance journalière de l'état général des souris ; euthanasie par des expérimentateurs confirmés à la fin des expérimentations ou en cas de stress durable) ; "Remplacer" le modèle in-vivo dans le projet n'est pas possible, du fait des objectifs qui imposent d'expérimenter sur ces animaux sauvages, considérées d'ailleurs comme nuisibles.

Notre second objectif est de déterminer les processus évolutifs et les bases génétiques à l'origine de la variation de la personnalité sur le gradient d'invasion. Nous réaliserons pour cela le génotypage par séquençage (technologie haut-débit) de milliers de marqueurs génétiques sur les tissus d'une partie des souris sauvages euthanasiées ($n = 120$). Des analyses de génomique des populations sur ces données permettront de reconstruire l'histoire démographique de la souris au Sénégal. Nous combinerons les données génomiques et expérimentales obtenues pour comprendre comment a évolué la personnalité chez la souris sauvage au cours de l'invasion, et identifier ses bases génétiques.

Le projet propose des avancées sur des fronts de science majeurs tels que le rôle de la personnalité en biologie de l'invasion, l'architecture génétique de traits complexes et les mécanismes sous-tendant leur évolution. Il répond également à une forte demande sociale visant à développer les recherches pour mieux comprendre les invasions biologiques. Son intérêt sociétal et scientifique est renforcé par son application à une espèce envahissante majeure en Afrique.

13369 Les pathologies vestibulaires sont caractérisées par des épisodes imprévisibles de vertiges accompagnés de déséquilibres oculomoteurs et posturaux. Ces crises de vertige sont souvent accompagnées d'étourdissements et de nausées. Les pathologies vestibulaires chroniques sont

très invalidantes et conduisent à un isolement psychologique et social. La prévalence des vertiges en clinique est très importante, de l'ordre de 20 à 30%, et augmente avec l'âge. Les vertiges vestibulaires peuvent être liés à des atteintes du système nerveux périphérique et notamment des organes vestibulaires de l'oreille interne ou du nerf cochléo-vestibulaire. Les pathologies touchant l'oreille interne ont souvent des conséquences auditives et vestibulaires. Alors que les surdités partielles ou totales sont facilement identifiées et mesurées expérimentalement chez la souris, les troubles vestibulaires sont difficiles à identifier et rarement quantifiés.

Chez l'homme, le meilleur test consiste à mesurer les réflexes vestibulo-oculaires par vidéo-oculographie, une pratique réalisée dans la plupart des centres ORL.

Le présent projet porte sur la quantification comportementale des réflexes vestibulaires et visuo-moteurs de souris présentant des suspicions de troubles vestibulaires ou visuo-moteurs.

Après chirurgie préliminaire permettant l'implantation d'une casquette destinée à maintenir les animaux tête fixe, la technique utilisée consiste à filmer les mouvements des yeux (vidéo-oculographie) en réponse à des stimulations des voies réflexes vestibulaire (réflexe vestibulo-oculaire) ou visuelle (réflexe optocinétique). L'intervention chirurgicale est réalisée sous anesthésie générale avec des antalgiques afin d'éviter toute douleur aux animaux ; les enregistrements sont non invasifs. A la fin, les souris subiront une perfusion intracardiaque sous anesthésie générale profonde afin de fixer des organes et des tissus de l'oreille interne pour permettre des analyses corrélées structures/ fonctions. Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet utilisera au maximum un total de 675 souris sur 5 ans, ce nombre pourra être diminué en fonction des demandes.

Il s'agit d'un projet de neurophysiologie intégrative qui ne peut être conduit que sur animal entier, le remplacement des animaux n'est donc pas encore possible ; cependant une meilleure compréhension des pathophysiologies vestibulaires le permettra à terme.

La méthode de quantification des réflexes vestibulaires par vidéo-oculographie est la technique expérimentale de phénotypage la plus précise et la plus raffinée permettant d'établir des corrélations entre des troubles vestibulaires périphériques et des déficits comportementaux. Elle participe à des avancées décisives dans la compréhension des affections de l'oreille interne en permettant la mise au point de nouveaux traitements.

13370 Le traitement de la douleur reste un sujet d'actualité car malgré l'efficacité reconnue de certains analgésiques, ceux-ci ne sont pas efficaces sur tous les types de douleurs. En effet la douleur est un symptôme qui a des origines très diverses et qui implique des mécanismes et récepteurs très différents.

La douleur est un phénomène complexe de ressenti qui se manifeste et se mesure par un mouvement/réaction spontané ou provoqué par un stimulus douloureux. Il existe des douleurs dites neuropathiques qui sont dues à la lésion d'un ou plusieurs nerfs suite à :

- Un dommage mécanique local (écrasement ou section d'un nerf => mononeuropathie)
- Un diabète (atteinte de plusieurs nerfs => polyneuropathie)
- Un traitement médicamenteux, tel qu'un traitement par des anti-cancéreux (atteinte de plusieurs nerfs=>polyneuropathie).

L'efficacité d'un composé sur le traitement de la douleur ne peut se faire sans le recours à l'animal. Dans ce but, différentes neuropathies humaines ont pu être mimées chez le rongeur. Dans ce projet, différents types de neuropathies sont étudiées chez le rat ou la souris. L'utilisation de ces 2 espèces est nécessaire car les récepteurs à certains composés ne sont pas les mêmes entre le rat et la souris.

La réalisation de ces études chez l'animal pour identifier l'efficacité des composés suit le cheminement suivant :

- Induction de la neuropathie (chirurgie ou administration des agents d'induction)

- Mesure du niveau de douleur générée au niveau d'une patte ou de la queue soit par une simple observation si la douleur est spontanée (exemple l'animal ne pose pas une patte, ou la lèche) ou par des tests de stimulation (retrait de la patte ou de la queue en réaction à un contact, une pression, une température...)

- Traitement des animaux avec le composé à tester

- Prélèvements de sang et de tissus en fin d'étude

Plusieurs dispositions sont mises en place pour réduire au maximum la douleur générée par les neuropathies, par les tests utilisés et ainsi assurer le bien-être des animaux :

- Ne sont testés chez l'animal que les composés sélectionnés dans des modèles cellulaires *in vitro* en démontrant une activité sur des cibles visées.

- Les doses de composés à ne pas dépasser chez le rongeur, sont déterminées dans une étude de tolérance avant de commencer les études dans ce projet.

- Les rongeurs seront hébergés en groupe avec un enrichissement dans leur cage (matériel permettant aux animaux d'exercer leurs instincts naturels, tel que des bâtons pour le rongement, des tunnels pour se cacher ou du coton pour nidifier).

- Les modèles de neuropathies et les tests utilisés sont bien documentés dans la littérature scientifique et certains sont déjà maîtrisés dans notre laboratoire.

- Pour les neuropathies par lésions mécaniques la chirurgie est pratiquée sous anesthésie générale gazeuse permettant un réveil rapide. Un analgésique (déterminé ultérieurement) sera injecté sous la peau avant l'incision qui sera d'environ d'un cm. La chirurgie a une durée inférieure à 15 minutes et la température corporelle des animaux est contrôlée.

L'utilisation prolongée d'anti-douleur n'est pas envisageable pour ne pas interférer avec le composé testé.

Les animaux sont observés quotidiennement et pesés régulièrement. Une grille de points limites est utilisée afin d'identifier les animaux devant être mis à mort avant que leur état ne se dégrade. Dans le même but, une durée maximale d'étude a été définie pour chaque modèle afin de ne pas atteindre les éventuels effets secondaires des pathologies notamment ceux liés au diabète.

Pour réduire la douleur induite par les tests utilisés ou pour mesurer la douleur provoquée (par une augmentation de la sensibilité à la pression, à la température...), l'animal a toujours la possibilité de retirer librement sa patte, de plus par sécurité, une valeur maximale à ne pas dépasser est définie pour chaque test.

Les composés peuvent-être administrés à l'animal par différentes voies (sous-cutanée, intra-dermique, intra-musculaire ou directement dans le liquide céphalo-rachidien...). La plupart des administrations étant simples et rapides, celles-ci sont réalisées chez l'animal éveillé. Celles plus précises et nécessitant une immobilité totale de l'animal sont pratiquées sous anesthésie générale gazeuse. La voie d'administration choisie est celle la plus adaptée au modèle utilisé.

Des tests de comportement et des prélèvements de sang ou de tissus pourront être réalisés sur le même animal fournissant des résultats complets en utilisant moins d'animaux.

Pour chaque test une évaluation statistique est faite afin d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour permettre de tirer des conclusions scientifiques.

Une estimation de 4800 rats et 4800 souris est proposée sur les 5 ans de validité du projet.

13371 Les traumatismes de la main sont parmi les lésions les plus fréquemment rencontrées chez les militaires déployés en missions extérieures. Ils sont le motif de près de 10% des évacuations sanitaires. Ces traumatismes causent parfois des amputations digitales partielles ou complètes dont la prise en charge sur les théâtres d'opérations extérieures est difficile, sinon impossible, du fait de l'absence de microscope dans les formations chirurgicales de l'avant. Si une évacuation sanitaire rapide vers un service spécialisé en métropole est envisageable dans le cas d'une ischémie froide (avec un fragment amputé conservé en milieu réfrigéré), il n'y a pas d'autre solution que de tenter une réparation vasculaire sur place en cas d'amputation partielle avec ischémie chaude. En effet,

le délai d'évacuation le plus court entre les théâtres d'opérations actuels et la France est de 24 heures environ.

Le projet consiste en une étude expérimentale en microchirurgie destinée à évaluer la possibilité de réaliser des anastomoses vasculaires de petits diamètres (moins de 2 millimètres) sans recours à un microscope opératoire conventionnel dans le cadre de la prise en charge des plaies de la main complexes en contexte de soins dégradés. Cette situation se rencontre régulièrement où les chirurgiens militaires sont déployés avec des moyens techniques limités, mais aussi dans les pays émergents où nombre d'hôpitaux ne possèdent pas de microscope. Or, le traitement d'un doigt traumatisé en ischémie nécessite idéalement le recours à des instruments optiques puissants pour réparer des artères de tout petit diamètre (entre 1 et 2 mm). En pratique, des revascularisations digitales ont déjà été effectuées en situation précaire mais de façon exceptionnelle, en utilisant de simples loupes grossissantes (x 3,5 à x 4,5 habituellement) et des instruments chirurgicaux basiques (accessibles à tous à bas prix).

Par ailleurs, l'enseignement de la microchirurgie dans les pays émergents est actuellement facilité par l'utilisation des smartphones qui, en mode photo avec zoom, peuvent être utilisés comme un microscope de faible puissance (x 3.5 à x 5 avec les derniers modèles les plus communs).

Si l'hypothèse a été démontrée dans plusieurs publications sur la faisabilité de réaliser des anastomoses vasculaires de faibles diamètres sans utilisation de microscope opératoire, il nous a paru nécessaire de la tester avant toute intervention chez l'Homme et d'en mesurer les réels bénéfices qu'on peut en retirer (% de réussite, temps de réalisation) lorsqu'on est confronté à des situations en milieux hostiles.

Une première partie de l'étude a été réalisée en ex-vivo sur silatic et avec des nouilles japonaises évidées. Mais les résultats obtenus ne peuvent pas garantir la perméabilité des anastomoses car ces tissus inertes ne reproduisent pas toute la complexité des facteurs thrombogènes du flux sanguin, ni la fragilité des vaisseaux. Le recours aux animaux vivants est donc nécessaire pour garantir le succès de la technique de suture.

Le projet portera sur un nombre de 40 rats. L'ensemble des manipulations sera effectué par un même opérateur, expérimenté en chirurgie de la main, en microchirurgie et habitué à assurer des interventions en situation difficile. Tous les animaux seront anesthésiés de façon adaptée et une prise en charge de la douleur sera réalisée.

La technique consistera en la dissection et anastomose (suture vasculaire) de l'aorte abdominale du rat. 4 lots de 10 rats seront étudiés et comparés : 1 lot avec anastomoses réalisées sous microscope conventionnel, 1 lot avec anastomoses réalisées sous loupe grossissantes, 1 lot avec sutures effectuées à l'aide d'un smartphone et un dernier lot fait avec une tablette informatique. Ce nombre de 10 rats par lot est un nombre minimum et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables.

Tous les animaux seront euthanasiés en fin de procédure par surdosage anesthésique.

13372 Ce projet a pour objectif d'étudier chez la souris la physiologie des stéroïdes contenus dans le tissu testiculaire.

Le rendement en spermatozoïdes générés *in vitro* reste à ce jour assez faible. L'objectif plus particulier de ce travail est donc de pouvoir déterminer si le faible nombre de spermatozoïdes générés *in vitro* à 30 jours de culture est lié ou non à une dérégulation de la balance androgènes / estrogènes par rapport aux conditions physiologiques. Les animaux utilisés pour les techniques *in vivo* et *in vitro* seront de la même souche (souris CD-1e).

L'optimisation du système de production *in vitro* de spermatozoïdes chez la souris constitue un préalable au transfert de la technologie chez l'homme dans le cadre d'une préservation de la fertilité dans le contexte d'une prise en charge lors de cancers. En effet l'objectif à terme est de pouvoir proposer aux enfants atteints de cancer avant la puberté la possibilité de préserver du tissu gonadique (congélation en vue d'une spermatogenèse complète *in vitro* à l'âge adulte).

Pour cela des cultures *in vitro* seront faites et les concentrations seront recherchées dans le testicules ainsi qu'au niveau plasmatique sanguin.

Deux stéroïdes seront recherchés : une hormone androgène, la testostérone, ainsi qu'une hormone œstrogène, l'estradiol.

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

Remplacement :

La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine de la recherche biologique. Le modèle *in vivo* est indispensable afin de pouvoir vérifier les niveaux de stéroïdes en conditions physiologiques. Dans ce contexte, ce modèle n'est pas remplaçable. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier les taux de stéroïdes en conditions physiologiques et dans les tissus gonadaux. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal, le remplacement n'est donc pas possible.

Réduction :

Nous consultons un biostatisticien avant de procéder à de telles études pour s'assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. Un total de 36 souris sera utilisé pour la totalité du projet.

Raffinement :

Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés.

Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. De plus, les procédures considérées dans ce projet prévoient l'utilisation d'une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie adéquate.

13373 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui souhaite tester l'impact d'un composé X sur la performance musculaire au niveau musculaire chez la souris âgée. Cette étude fait directement suite à un projet autorisé (qui a permis de mettre en évidence un impact du composé X sur la synthèse protéique et le fonctionnement mitochondrial au niveau du muscle squelettique chez la souris âgée) et vise à déterminer l'impact de ces modifications cellulaires sur la performance musculaire en condition d'exercice ou de sédentarité. En effet, le composé X est développé principalement dans le but de traiter ou de prévenir les conditions liées à l'âge et notamment la fonte musculaire et la perte de tonus musculaire. Les composés seront administrés par le biais de la nourriture (nourriture hyperprotéinée) pendant 10 semaines à des souris sauvages âgées de 18 mois. Les groupes expérimentaux seront formés après une mesure de composition corporelle (mesure des pourcentages de masse maigre, de masse grasse et de fluide par Résonance Magnétique Nucléaire) et un premier test de performance réalisé sur tapis roulant de façon à obtenir des groupes homogènes du point de vue de leurs niveaux de masse maigre et de leurs performances physiques. A l'issue de ce premier test, les animaux recevront le traitement, puis une moitié des effectifs sera soumise à des entraînements sur tapis roulant deux fois par semaine pendant les 10 semaines de l'étude, alors que l'autre moitié restera sédentaire. Lors de la 9ème semaine, les animaux seront soumis à un grip test. A l'issue de la 10ème semaines de traitements, l'ensemble des animaux seront soumis à une nouvelle mesure de composition corporelle et un second test de performance. Le lendemain, les animaux seront profondément anesthésiés et un prélèvement sanguin sera réalisé par ponction cardiaque avant euthanasie. Les muscles quadriceps, gastrocnémiens, soleus, tibialis, vastus lateralis, long extenseur des orteils, le foie, le cœur et le tissu adipeux blanc sous-cutané seront alors prélevés pour analyses ultérieures.

Pour cette étude, un total de 60 souris sera utilisé, divisée en 4 groupes expérimentaux :

- Groupe 1 : Souris sédentaires / Vehicule (Contrôles sed. ; n=15)
- Groupe 2 : Souris sédentaires / Composé X (n=15)
- Groupe 3 : Souris non sédentaires / Vehicule (Contrôles non-sed. ; n=15)
- Groupe 4 : Souris non sédentaires / Composé X (n=15)

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés par groupes de 5 en cages individuellement ventilées et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de maisons dôme et de matériel de nidification. L'administration des composés via la nourriture limite fortement la manipulation des animaux et permet de s'affranchir de toute procédure d'administration invasive. La nourriture administrée sera une nourriture enrichie en protéine, adaptée aux souris âgées. Les mesures de composition corporelle se feront chez l'animal vigile avec des temps de mesure de l'ordre de 1 minute. Tous les tests nécessitant l'utilisation des tapis de course seront réalisés sous contrôle permanent d'un expérimentateur. L'ensemble des prélèvements terminaux seront réalisés sous anesthésie (sang) ou post-mortem (organes). Enfin, bien que le protocole soit très peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.
- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe (n=15) a été calculé comme étant le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.
- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'efficacité réelle d'un composé sur la performance musculaire.

13374 Le cartilage articulaire est un tissu non innervé et non vascularisé qui se régénère très peu et cicatrise difficilement. Malheureusement, il peut être le siège de lésions liées à des traumatismes ou au vieillissement. Ces altérations tissulaires conduisent à une destruction irréversible de la matrice extracellulaire, et entraîne le plus souvent des douleurs chroniques réduisant la mobilité des personnes. A terme, l'articulation touchée est remplacée par une prothèse. Actuellement, il n'existe aucune molécule pharmacologique capable de restaurer les propriétés anaboliques des chondrocytes (cellules du cartilage). Ce constat a amené les chercheurs à tenter de remplacer le cartilage détruit par des approches d'ingénierie tissulaire. Ces techniques font appel à l'ingénierie cellulaire (notamment avec des cellules souches), associée à des biomatériaux qui servent de support. L'idée est d'utiliser un greffon immature qui poursuivra sa croissance au sein de l'environnement dans lequel il est implanté. Les premiers essais cliniques ont donné des résultats encourageants, faisant la preuve du concept. Cependant, le cartilage neoformé ne possède pas toutes les caractéristiques d'un cartilage hyalin : sa composition, sa structure et ses propriétés mécaniques sont différentes d'un cartilage articulaire hyalin « naturel ». Par conséquent, il est nécessaire d'améliorer les protocoles notamment en modifiant génétiquement les cellules souches. Nous et d'autres avons montré l'importance des régulations épigénétiques au cours de l'ossification endochondrale (formation du cartilage) et de la chondrogenèse (différenciation des cellules souches). En particulier, certaines « histone deméthylases » jouent un rôle important dans ces processus. Ces données suggèrent qu'agir sur ces mécanismes pourraient permettre d'améliorer la chondrogenèse des cellules souches lors des protocoles d'ingénierie tissulaire du cartilage, et ainsi permettre d'acquiescer et de maintenir dans le temps un cartilage de bonne qualité. Nos travaux actuels réalisés *in vitro* nous confortent dans cette hypothèse. Cependant, des analyses *in vivo* dans des modèles murins sont nécessaires pour valider définitivement cette hypothèse en permettant des études à plus long terme, et ainsi une différenciation complète des cellules souches en chondrocytes, et la formation d'un tissu cartilagineux.

Nous proposons d'étudier la différenciation des cellules souches et la matrice cartilagineuse formée après implantation, en sous-cutanée dans des souris nude, de billes d'alginate (environ 0.3mm de diamètre) contenant des cellules souches humaines ayant été transfectées au préalable avec des vecteurs d'expression pour les deux « histone déméthylases » ayant montré des effets bénéfiques

in vitro, ou pour la GFP (protéine fluorescente), condition qui servira de contrôle ainsi qu'un suivi des cellules, et prédifférenciées en chondrocytes dans un milieu de différenciation adéquate pendant une semaine. A 4, 8 et 12 semaines, les animaux seront mis à mort et les implants retirés. Le tissu néoformé ainsi que l'état de différenciation des cellules seront ensuite étudié par des analyses histologiques, immunohistologiques et moléculaire.

Cette étude est basée sur l'expérimentation animale et prend en compte la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-après.

Le modèle murin combine les avantages de permettre une différenciation complète des cellules souches en chondrocytes, permettant la formation d'une matrice cartilagineuse, et de réaliser des expériences à moyen/long terme pour observer le devenir du tissu néoformé. Les données *in vivo* sont donc indispensables afin d'induire un processus complet de chondrogenèse. Par ailleurs, les procédures décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité visant à étudier les aspects fondamentaux du rôle des « histone déméthylases » dans la chondrogenèse et le bénéfice de moduler leur expression pour améliorer les protocoles actuels d'ingénierie tissulaire en permettant la formation d'un néocartilage de bonne qualité. De fait, les expériences ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Concernant la réduction du nombre final d'animaux nécessaires, nous avons fait des recherches bibliographiques, des mises au point des expériences afin d'utiliser le plus faible nombre d'implants possible pour chaque type analyse, et des calculs statistiques afin d'estimer le minimum d'animaux nécessaire à l'étude. Par ailleurs, nous prévoyons d'implanter 4 greffons (biomatériaux cellularisés) simultanément par souris. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet est de 330.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, l'état de chaque souris sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. L'animal sera immédiatement soigné s'il présente des blessures légères. En revanche si un animal montrait des signes cliniques de souffrance celui-ci serait immédiatement retiré du protocole (d'après le point limite décrit pour le projet).

13375 La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies rares. Dans la population caucasienne, la maladie représente environ une naissance sur 4500. Il s'agit d'une maladie mortelle qui touche principalement les poumons, le pancréas, l'intestin, les glandes sudoripares et qui s'exprime dès la petite enfance avec une prise en charge lourde et onéreuse. Les progrès importants dans la prise en charge des symptômes de la maladie et les possibilités de transplantations d'organes ont conduit à une augmentation importante de l'espérance de vie des patients.

Les modèles animaux ont largement participé à la connaissance de la pathologie. Les modèles souris expriment certaines caractéristiques de la pathologie, notamment des obstructions intestinales sévères, mais ils ne présentent pas de manifestations pulmonaires. Or c'est l'insuffisance pulmonaire chez l'humain qui est la principale cause de mortalité. En revanche des études précédentes ont montré que le rat pouvait représenter un modèle intéressant pour le phénotype respiratoire de la mucoviscidose. Sa taille environ 10 fois supérieure à celle d'une souris permet également l'accès à certaines expériences impossibles à réaliser avec des souris

Nous avons récemment développé une lignée de rats porteurs de la mutation la plus fréquente chez l'homme ce qui en fait un modèle extrêmement intéressant pour l'étude de l'histoire de la maladie ainsi que pour les études précliniques de l'efficacité de nouvelles molécules. L'élevage de ce rat nécessite une prise en charge alimentaire et médicamenteuse pour lui permettre de parvenir à l'âge adulte. En effet les animaux malades peuvent manifester des risques d'obstructions intestinales fatales. L'administration d'un laxatif dans l'eau de boisson ainsi que la fourniture d'une nourriture adaptée permet de limiter cette mortalité. De plus, une attention particulière sera apportée à l'apparence physique et au comportement de l'animal dans le but de détecter des événements indésirables non prévus (tumeurs, lésions cutanées). Notamment la présence d'une nourriture humidifiée ou sous forme de gel peut entraîner des problèmes d'absence d'usure au niveau des

incisives à croissance continue. Les dents peuvent être alors taillées avec des ciseaux, sans douleur pour l'animal, de manière à lui permettre de se nourrir normalement.

L'objectif de ce projet est donc le développement de cette lignée pour mettre à disposition des animaux d'intérêt pour les chercheurs qui travaillent sur la mucoviscidose et veulent utiliser ce modèle ou bien dans le cadre de collaborations avec des équipes extérieures.

Nous aimerions pouvoir disposer de 500 rats au maximum sur une durée de 5 ans

13376 Les maladies métaboliques telles que le diabète et l'obésité sont en constante augmentation dans les pays industrialisés. La pathogénèse de ces maladies est complexe et multifactorielle. Les causes premières d'apparition de ces troubles lorsqu'ils ne sont pas d'origine génétique sont liées une alimentation riche en sucre et en gras et un mode de vie sédentaire. L'exposition à certains produits chimiques, dits « obésogènes environnementaux » est également suspectée de jouer un rôle dans l'apparition et/ou l'évolution de ces pathologies. Les récepteurs nucléaires jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique et pourraient être médiateurs des effets de ces « obésogènes environnementaux » sur le développement de troubles métaboliques. Nous nous intéressons plus particulièrement aux récepteurs nucléaires CAR, PXR, PPAR α et PPAR γ . Ce projet d'une durée de 5 ans vise à évaluer l'impact d'un mélange de contaminants alimentaires ainsi que le rôle des récepteurs nucléaires CAR, PXR, PPAR α et PPAR γ *in vivo* chez la souris. Les contaminants étudiés sont les composés perfluorés, les phtalates, les bisphénols, les organoétains et les pesticides connus pour leur caractère obésogène. Ces composés seront administrés seuls puis en mélange par gavage oral à des souris C57BLJ de type WT ou invalidées pour les récepteurs nucléaires CAR, PXR, PPAR α et PPAR γ en aiguë (3 jours) ou pour une période de 28 jours. Des prises de sang seront effectuées et le foie des souris sera récupéré après euthanasie. L'activation de ces récepteurs sera évaluée par mesure d'expression de leurs gènes cibles prototypiques (Par exemple Cyp2b10 pour CAR et Cyp3a11 pour PXR). Les effets sur l'homéostasie énergétique seront évalués par mesure du poids des animaux, de la glycémie, de la tolérance au glucose et à l'insuline, la lipidémie et la stéatose hépatique. Nous envisageons d'utiliser 3840 animaux au total. Ce projet a été conçu et sera réalisé autour du principe des 3R. Pour cela un abri en aluminium permettant aux souris de s'abriter sera placé dans toutes les cages. Nous utilisons des animaux vivants car nous nous intéressons pour ce projet au métabolisme énergétique qui implique le dialogue de nombreux organes entre eux (foie, pancréas, intestin, tissu adipeux, muscle et système nerveux central). Les groupes expérimentaux seront composés de 8 souris par groupe pour les études en aiguë et de 12 animaux par groupe pour les études en chronique (soit un total de 240 lots de 8 souris et 160 lots de 12 souris). Ce nombre correspond à ce qui est suffisant et minimal pour une puissance statistique appropriée à la détection de perturbations du métabolisme énergétique induits par les contaminants. Le nombre de 12 par groupe pour le groupe d'exposition chronique est lié au fait que des tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline sont réalisés sur ces animaux. Les doses utilisées sont celles ne générant pas de toxicité pour les animaux. Cette saisine regroupe plusieurs projets ; les protocoles réalisés seront identiques pour chaque projet. Ce qui changera, est la nature des molécules administrées.

13377 La transplantation cardiaque est le traitement de choix des patients en insuffisance cardiaque terminale malgré un traitement médical optimal, mais est largement limitée par la pénurie de greffons éligibles, qui se limitent actuellement aux organes provenant des donneurs en mort encéphalique. Une alternative serait d'utiliser des greffons cardiaques issus des donneurs marginaux, tels que les donneurs décédés par arrêt cardiaque. Cependant, ces greffons, issus de ces donneurs limites, sont très sensibles à l'ischémie et présentent ainsi un risque accru de dysfonctions du greffon. Il est donc nécessaire de reconditionner ces greffons chez le donneur ou durant la phase de conservation extra-corporelle, afin qu'ils soient également éligibles à la transplantation. En effet, comme pour le rein, le reconditionnement d'organe a montré des bénéfices majeurs sur la qualité du greffon, la reprise de fonction et la survie de celui-ci.

Notre objectif est donc de modéliser et d'évaluer chez le porc l'intérêt du reconditionnement du greffon cardiaque issu de ces nouveaux donneurs ; reconditionnement chez le donneur par préservation *in situ* ou via un traitement pharmacologique.

Pour mener à bien ce projet, les transplants cardiaques seront issus du modèle porcin de donneurs décédés par arrêt cardiaque de la catégorie III de Maastricht. Les greffons cardiaques seront reconditionnés ou non, prélevés, lavés puis conservés en hypothermie dans une solution de référence pour la conservation cardiaque. Nous utiliserons un animal receveur allocompatible avec mise en place d'une circulation extra-corporelle par sternotomie médiane, explantation du cœur et greffe du transplant cardiaque puis sevrage de la circulation extra-corporelle. En post-opératoire, l'animal sera réveillé et suivi pour analyser la reprise de fonction cardiaque. Pour ce projet nous utiliserons 49 animaux.

La règle des 3 R a été prise en compte: 1) Ce processus expérimental ne peut être remplacé par un protocole *in vitro*. Seul un protocole *in vivo* peut reproduire la complexité des mécanismes physiologiques retrouvés lors de la transplantation chez l'homme. 2) Le nombre d'animaux par groupe est réduit au maximum, découlant d'un test de puissance pour définir le nombre d'animaux par groupe permettant de réaliser des tests statistiques pour identifier des différences biologiques et histologiques entre les groupes. 3) Le raffinement de cette étude a également été pris en compte, les animaux seront hébergés dans des locaux adaptés à proximité de leurs congénères permettant de les voir et de les sentir, avec enrichissement adapté à l'espèce. De plus les traitements anesthésiques et analgésiques ont été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire au minimum la souffrance des animaux.

13378 Comprendre la réponse des organismes aux variations environnementales est un enjeu majeur en écologie. La clarification des mécanismes physiologiques impliqués est une étape indispensable. Dans ce contexte, les interactions entre les contraintes hydriques et thermiques demeurent peu considérées. La régulation de la balance hydrique pourrait jouer un rôle clé dans les compromis physiologiques et comportementaux. L'objectif principal de ce projet est d'évaluer dans quelle mesure, un petit vertébré terrestre, le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) ajuste sa physiologie à des conditions thermiques et hydriques contrastées. Cette étude sera menée sur les femelles adultes pendant la gestation qui est une étape particulièrement exposée aux contraintes météorologiques.

Pour ce faire, nous étudierons les effets de conditions thermiques contrastées avec 2 températures moyennes (20°C et 25°C) à l'aide de chambres climatiques. Sur ces deux conditions thermiques, deux modalités d'accès à l'eau seront réalisées : accès permanent ou limité à l'eau en se basant sur un protocole précédemment réalisé. Les traitements expérimentaux choisis sont dans la gamme des conditions naturelles auxquelles sont exposés les individus dans leur milieu et sont éloignées des seuils critiques. En effet nous voulons précisément comprendre les effets de conditions climatiques actuelles sur la réponse des individus en se basant sur la connaissance de la sensibilité de l'espèce. Ces conditions n'entraînent donc pas de risque de mortalité. Nous étudierons les effets sur la dynamique de la gestation (date de mise bas) les paramètres physiologiques maternels et les caractéristiques des jeunes. Etant donné la forte variabilité inter-individuelle des réponses à la restriction d'eau chez les reptiles, nous utiliserons un maximum de 35 femelles adultes dans chaque traitement soit un total de 140 femelles gestantes issues de différentes populations naturelles. Le nombre maximum de jeunes obtenus sera de 700. L'effectif total sera donc de 840 individus (140 mères+700 jeunes). Les individus (mères et jeunes) seront replacés sur le terrain à l'issue de l'étude. La captivité temporaire est très bien maîtrisée pour l'espèce.

Le lézard vivipare est particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de sa forte dépendance aux zones humides en conditions naturelles. Notre hypothèse générale est que les contraintes thermiques et hydriques confrontent l'organisme à des compromis physiologiques importants. Cela devrait être particulièrement le cas lors de la gestation puisque les femelles doivent assurer la régulation de la balance hydrique et thermique de embryons. Les effets maternels associés à cette période de stress hydrique et thermique modéré devraient interagir avec l'environnement post-natal de manière à optimiser le développement des juvéniles.

La règle des 3 R a été prise en compte de la manière suivante:

- Remplacement: les questions étudiées concernent spécifiquement les lézards vivipares qui est une espèce adaptée aux climats froid. Un remplacement n'est donc pas envisageable
- Réduction: Nous avons réduit au minimum les effectifs par traitement (35 femelles gestantes) pour pouvoir détecter des effets. Le nombre de session de prises de sang sera réduit à 3 pendant la gestation
- Raffinement: les conditions de captivité seront adaptées avec un enrichissement du milieu (différents type d'abris) qui permettra au femelles gestantes d'assurer leur reproduction dans des conditions d'hébergements optimisées

13379 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est une bactérie qui infecte l'estomac de la moitié de l'humanité. Elle est responsable de gastrite, d'ulcères gastriques et duodénaux et de cancer de l'estomac. Cette infection est la 4ème cause de cancer et la 2ème cause de mort par cancer dans le monde. Elle est responsable de 6000 décès en France chaque année. L'infection à *H. pylori* peut être guérie par un traitement associant 2 à 3 antibiotiques à un inhibiteur de la pompe à proton, prévenant la récurrence des ulcères et l'évolution vers le cancer. Les résistances aux antibiotiques sont responsables d'échecs de traitement, leurs fréquences n'ont cessé de croître depuis 20 ans. L'OMS a classé *H. pylori* comme le 6ème pathogène prioritaire pour la recherche et le développement de nouveaux traitements.

Les aurones, peptides naturels de la classe des flavonoïdes, ont des activités antibactériennes et anti-oxydantes. Une sélection de peptides synthétiques a été testée *in vitro* sur plusieurs espèces bactériennes. Deux d'entre eux ont une activité anti-*H. pylori*.

Après avoir démontré cette activité *in vitro*, notre objectif est de tester l'activité de ces molécules *in vivo* dans un modèle murin de souris C57BL/6 infectées expérimentalement par la souche SS1 d'*H. pylori*. Les résultats attendus de cette expérimentation sont une diminution, voire une disparition du nombre de *H. pylori* de la muqueuse gastrique des souris infectées depuis 3 semaines, 3 jours après l'inoculation intra-gastrique de deux concentrations des 2 molécules. Nous utiliserons au maximum 60 souris divisés en 5 groupes (1 groupe contrôle et 4 groupes traités par deux concentrations des deux molécules testées).

La règle des 3 R a été prise en compte : 1) Remplacer: Ce processus expérimental suit un protocole *in vitro* qui a démontré l'activité anti-*H. pylori* des deux molécules et doit précéder un protocole sur volontaires sains. Le protocole murin proposé permet d'étudier *in vivo* la complexité de l'infection de la muqueuse gastrique. 2) Réduire: Le nombre d'animaux par groupe (12 animaux par groupe) est réduit au maximum, justifié et défini par un calcul de puissance, permettant de réaliser des tests statistiques pour mettre en évidence des différences statistiques de la charge bactérienne de la muqueuse gastrique. 3) Raffiner: Le raffinement de cette étude a également été pris en compte, les animaux seront hébergés dans des locaux adaptés avec enrichissement du milieu et suivi quotidien de leur état de santé.

13380 Le but principal de ce projet est de mettre en place un protocole pour étudier le comportement social en groupe des rongeurs. En effet, des déficits du comportement social sont souvent associés aux maladies psychiatriques telles que l'addiction, la dépression, la schizophrénie et l'autisme. Les tests utilisés couramment chez les rongeurs utilisent des interactions courtes (quelques dizaines de minutes) entre 2 seuls animaux mais ces tests ont des limites évidentes dans leur capacité de mettre en lumière des déficits qui sont transposables à l'Homme. Des approches récentes utilisent la possibilité d'identifier des souris grâce à des puces individuelles qui émettent un signal radio (rf-ID ou radio frequency identity) et de les suivre en groupe (4 souris ou plus) pendant plusieurs jours, 24h/24h. Ce projet vise à mettre en place cette procédure dans notre laboratoire et de l'adapter aux rats. Il s'agit d'une série d'expériences préliminaires pour valider les conditions qui seront utilisées dans des projets futurs.

Ces expériences se dérouleront en 2 phases différentes.

La phase 1 correspond à une courte chirurgie pour implanter les puces rf-ID chez les animaux.

La phase 2 correspond à la phase des tests pour vérifier, analyser et quantifier les comportements naturels des animaux en groupe (quantité et qualité des interactions sociales, dominance, etc.) et le fonctionnement du système de détection.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases du comportement normal et/ou pathologique, peut uniquement être mené sur un animal vivant (remplacer). Cette série d'expériences a pour objectif de mettre au point, sur un nombre limité d'animaux, des procédures qui seront ensuite utilisées dans des projets futurs (réduire). Pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux la chirurgie d'implantation des puces rf-ID sera réalisée sur anesthésie générale. De plus, les animaux seront hébergés en groupe de 4 à 8 dans un environnement enrichi (raffiner). Dans ce projet nous allons utiliser 56 animaux au maximum dont 28 souris et 28 rats. Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension des déficits sociaux associés aux maladies psychiatriques.

13381 L'établissement est agréé pour réaliser de procédures impliquant l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

Dans ce cadre, l'établissement réalisera pour une société externe non familiarisée avec la gestion des expérimentations chez l'animal une prestation nécessitant l'implant d'un dispositif médical pour la mesure de pression intracrânienne.

L'hydrocéphalie, pathologie neurochirurgicale fréquente, d'origine congénitale (1 à 4 naissances sur 1 000) ou induite à la suite de pathologies neurologiques lourdes (traumatisme crâniens sévères, AVC, méningites, tumeurs...) ne peut être traitée que par l'implantation d'une dérivation ventriculo-péritonéale (valve) sur le patient (cela représente 1 chirurgie toutes les 15 minutes). Ces dérivations présentent des taux de dysfonctionnement élevés (engendrant un drainage insuffisant ou trop important). Il est alors très compliqué pour les praticiens de poser un diagnostic sans avoir recours à des chirurgies exploratoires répétitives (43% des re-chirurgies sont liées à un remplacement de valves consécutives à une suspicion de dysfonctionnement). Les patients souffrent d'un confort de vie dégradé et se retrouvent dans des situations d'extrême urgence (une augmentation de la Pression Intra Crânienne – PIC - peut entraîner le décès du patient).

La société externe à l'origine de ce projet, développe un dispositif médical implantable communiquant, adressant les patients nécessitant une pause de valve de régulation ou ceux en possédant déjà une. Le dispositif permet de répondre à cette problématique sans même avoir à concevoir une nouvelle valve. C'est un dispositif médical de classe III (implantable long terme), adaptable à tout type de valve : il permet l'ajout d'un dispositif de mesure sur les valves existantes et déjà implantées aujourd'hui (sur les nouvelles implantations ou les remplacements de dispositifs anciens).

Cette brique technologique (dispositif de mesure et de transmission) permet ainsi une adaptation à l'ensemble des dispositifs quelle que soit la provenance de ces derniers du fait de la compatibilité de cette brique avec toutes les valves commercialisées et ainsi permettre une rapide diffusion de la technologie.

Le principe à la base de l'innovation est d'apporter une mesure de la pression intra cathéter afin que les médecins aient accès via une interrogation ponctuelle aux informations de pression de façon non invasive.

Maintenant, il leur est nécessaire de tester de dispositif médical *in vivo* et de le comparer au gold standard (Philips MX 400 sur dérivation externe) utilisée en routine clinique.

L'établissement utilisateur prendra en charge l'hébergement, et la réalisation des procédures avec le neurochirurgien responsable du projet pour 8 brebis sous anesthésie générale par du personnel formé et expérimenté.

Suivant les préconisations des 3R une attention particulière est faite afin d'anticiper et de prévenir toute forme de souffrance chez les animaux.

Le remplacement des animaux n'est pas possible, en vue de la nécessité de recueil des paramètres physiologiques, but de l'étude finale.

Concernant le raffinement des procédures expérimentales, un soin particulier au bien-être des animaux est dédié. Ceux-ci arrivent en livraison par un transporteur agréé. Les animaux sont pris en charge et bénéficient d'une période d'acclimatation dans leur box d'hébergement. Cette période de 7 jours minimum leur permet de s'habituer à leur nouvel environnement avant toute manipulation et elle évite le stress. Les animaux sont gardés dans des structures standard enrichies et conformes aux normes, en groupes sociaux de 2 brebis par stalle. Les box sont conformes aux normes européennes et bénéficient d'un environnement climatisé entre 19 et 21°C avec accès ad libitum à l'alimentation et l'eau. Des caméras de surveillance permettent de suivre les scores cliniques sans rentrer en contact avec les animaux afin de réduire au maximum leur stress.

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal.

Trois procédures seront utilisées sous anesthésie générale. L'analgésie visant à éviter la gêne occasionnée est assurée par l'injection systématique d'une analgésie adéquate au type de procédure et durée et répétée 12h post-chirurgie.

Dans tous les cas, le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel formé 7j/7.

13382 Les récepteurs du glutamate exprimés dans le cerveau jouent des rôles primordiaux (plasticité synaptique, oscillations) selon leur localisation. Nous avons montré qu'un récepteur en particulier, nommé mGlu3, induit des oscillations synchrones (dites oscillations thêta) de populations de neurones dans une région de l'hippocampe impliquée dans le codage de la mémoire et les rythmes du sommeil. Des perturbations de ces rythmes entraînent des troubles cognitifs. De plus, des polymorphismes du gène codant pour le récepteur mGlu3 sont corrélés à la schizophrénie. Ces troubles pourraient s'expliquer par une mauvaise localisation à la membrane et/ou un mauvais fonctionnement de ces récepteurs. La protéine PICK1 est un candidat qui pourrait s'assembler avec le récepteur mGlu3 dans les neurones et contrôler ses fonctions. L'objectif de ce projet est de caractériser le complexe PICK1-mGlu3 et son rôle dans les réseaux neuronaux hippocampiques, chez la souris.

Ce projet nécessitera l'utilisation de différentes lignées de souris (des souris sauvages, des souris déficientes en la protéine mGlu3, des souris "schizophrènes"). Nous allons réaliser des expériences de comportement couplées à des mesures de l'activité cérébrale (vidéo-électroencéphalogramme ou vidéo-EEG) chez les différentes lignées. Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux car elle adresse des mécanismes physio-pathologiques complexes qui ne peuvent pas être récapitulés par des modèles plus simples (ex. culture de neurones).

Les résultats issus de ces études pourraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de pathologies psychiatrique et/ou des troubles du sommeil.

Pour cette étude nous prévoyons d'utiliser 140 animaux. Nous tâcherons d'appliquer la réglementation des 3R de la façon suivante:

Remplacer: plusieurs méthodes *in vitro* basées sur la culture cellulaire ont été utilisées au préalable pour la caractérisation des interactions mGlu3-PICK1, permettant de vérifier notre hypothèse de départ avec des méthodes qui ne nécessitent pas d'animaux. Par contre, les effets physiopathologiques sur le sommeil que nous souhaitons étudier sont trop complexes pour être récapitulés *in vitro*. Néanmoins nous tâcherons d'obtenir le maximum d'informations en utilisant des préparations ex-vivo (ex. coupes de cerveau) avec la seule la mise à mort et le minimum de détresse pour l'animal.

Réduire: nous essayerons de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal: i) rythme veille/sommeil ; ii) localisation

du récepteur et des marqueurs neuronaux suite à l'extraction du cerveau et l'analyse immunohistochimique.

Raffiner: Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Par exemple les animaux seront hébergés en groupe sauf lors de l'implantation des dispositifs nécessaires pour enregistrer l'activité cérébrale, afin d'éviter le risque de blessure mutuelle (par ex. connecteurs arrachés). L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement par les expérimentateurs et tout signe de détresse ou problème de santé adressé au plus vite.

Nous utiliserons le test de Two-way Anova test pour comparer différents groupes (ex. génotypes différents, peptides différents). Afin d'appliquer les principes de réduction et raffinement, une étude statistique a été faite utilisant le logiciel GPower de données issues de la littérature d'expériences similaires à celles que nous proposons. Un test de puissance a donc permis de déterminer la nécessité de 10 animaux par groupe pour la bonne réalisation du projet.

13383 Le cancer colorectal (CCR) reste toujours la troisième cause de décès par cancer dans le monde malgré tous les progrès réalisés ces dernières années. Détecté à un stade précoce, il est de bon pronostic avec environ 90% de guérisons, mais lorsqu'il est découvert tardivement et qu'il présente des métastases, les chances de survie sont très faibles. Le récent développement de nouveaux médicaments dits de thérapies ciblées ont permis d'améliorer la prise en charge d'une proportion significative de ces patients en phase métastatique. Malheureusement, tous les patients ne répondent pas à ces thérapies et il est important de trouver des marqueurs prédictifs de réponse afin de mieux stratifier les patients « répondeurs/non-répondeurs » et d'améliorer l'efficacité de ces thérapies.

De manière intéressante, nos résultats sur les cellules en culture ont permis d'identifier la protéine SLAP comme un nouveau suppresseur de tumeur. De plus, nous avons pu observer que le niveau d'expression de cette protéine permet de prédire la sensibilité à certaines thérapies ciblées.

L'utilisation de modèles de tumeurs humaines chez la souris est maintenant essentielle pour confirmer ces résultats *in vivo* et pouvoir appréhender certaines étapes du processus tumoral qui sont impossibles à étudier *in vitro* sur des cultures de cellules ou sur d'autres modèles.

Pour cela, nous utiliserons deux modèles de xénogreffes chez la souris immunodéprimée : un modèle de xénogreffe sous-cutanée et un modèle de xénogreffe intrasplénique, qui permettront de tester respectivement l'effet des thérapies proposées sur la croissance tumorale et sur la formation des métastases. A terme, ces résultats pourraient permettre de proposer le niveau d'expression de SLAP comme un marqueur de réponse aux thérapies ciblées existantes dans le cancer du côlon.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante et des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues (enrichissement du milieu, suivi régulier des animaux, injection d'analgésiques en cas de douleur, ...).

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 192 souris sur une durée de 4 ans.

13384 La production, la migration et la maturation des neurones sont les étapes essentielles au développement des circuits neuronaux. Le cervelet contrôle la coordination précise des mouvements et de la posture et joue un rôle dans de nombreuses fonctions cognitives. Il abrite la population neuronale la plus nombreuse du cerveau, les neurones granulaires, qui subissent une prolifération massive et des voies de migration et de maturation spécifiques au cours des premières semaines après la naissance. On sait que les perturbations du développement cérébelleux entraînent plusieurs troubles moteurs graves et sont responsables du médulloblastome chez l'enfant.

Dans cette étude, nous étudierons le rôle spécifique d'une famille de protéines appelées Plexines, et en particulier la PlexineB2, dans le développement de cette population de neurones granulaires du cervelet. Les plexines sont connues pour réguler de nombreux aspects différents du

développement des neurones en général, tels que leur localisation, la formation de connexions synaptiques entre les neurones et la prolifération des précurseurs neuronaux. Dans le cervelet, PlexineB2 est exclusivement présent dans les neurones granulaires en division, tandis que PlexineA2 est présent dans ceux qui migrent. Sans ces plexines, la structure anatomique du cervelet est fortement perturbée. Bien que nous sachions où et quand ces plexines sont exprimées, il y a encore beaucoup de questions concernant leur fonction cellulaire et moléculaire précise.

Pour nos recherches, nous devons utiliser des animaux, en particulier des souris. On sait que le génome de la souris ressemble à celui de l'homme à plus de 98%. De plus, nous pouvons manipuler artificiellement leur code génétique pour modifier l'expression des gènes et des protéines qui nous intéressent. Nous utiliserons 8 lignées de souris différentes dans lesquelles l'expression d'une ou plusieurs protéines de plexine est éliminée soit dans le corps entier, soit seulement dans le cervelet. Ces souris nous permettront de comparer le développement du cervelet avec celui de souris contrôles. Nous pouvons comparer l'anatomie globale, mais par l'utilisation de différentes techniques nous pouvons aussi marquer des sous-ensembles de neurones et suivre leur morphologie étape par étape.

Ce projet a été défini en suivant la règle des 3R. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 4217 pour 5 ans et il y a 4 procédures expérimentales. Bien que le cervelet se développe principalement après la naissance, la migration des cellules progénitrices commence au stade embryonnaire. Il est donc nécessaire de couvrir toutes ces étapes. Par ailleurs, il est nécessaire de pouvoir comparer tous les différents génotypes.

Deux des procédures expérimentales qui seront utilisées sont basées sur l'électroporation de plasmides afin de pouvoir exprimer des molécules fluorescentes dans les cellules en migration et de pouvoir les observer soit en microscopie en temps réel, soit d'étudier leur devenir plusieurs jours après leur injection. Durant cette procédure les animaux sont anesthésiés et pour ceux qui sont maintenus en vie après électroporation, perçoivent un analgésique.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-205.

13385 La détection d'un cancer à une phase précoce de son développement augmente considérablement les chances de réussite du traitement. Un diagnostic plus précoce de la tumeur permettrait ainsi d'éviter ou de réduire la mortalité, les douleurs, et les traitements parfois lourds, tels que les chimiothérapies. L'imagerie moléculaire par tomographie par émission de positons (TEP) est devenue un outil indispensable pour le diagnostic précoce, la caractérisation et le suivi du cancer. Elle associe l'injection de molécules radioactives qui permettent de cibler soit certains récepteurs surexprimés à la surface de cellules tumorales, soit certains mécanismes métaboliques impliqués dans l'activité des cellules tumorales.

Notre laboratoire est engagé depuis plusieurs années dans l'imagerie *in vivo* par imagerie TEP sur différents modèles de cancer comme par exemple les cancers du sein, du cerveau (notamment le gliome) et du poumon.

La compréhension du mécanisme d'action des marqueurs avec leur cible permettra de proposer des méthodes d'imagerie pour le diagnostic précoce. Elle conduira également à optimiser les traitements visant à éradiquer la tumeur en améliorant leur dose tout en prévenant l'apparition d'effets indésirables. Cette compréhension exige de connaître la pharmacodynamique et la pharmacocinétique du marqueur.

Les approches de pharmacologie *in vitro* participent à la compréhension des mécanismes d'interaction du marqueur et de sa cible, produisant des informations à l'échelle de la cellule. Des marqueurs peuvent être ainsi sélectionnés/modifiés. Cependant ces approches, *in vitro*, bien que nécessaires, ne sont pas suffisamment prédictives de l'efficacité et/ou de la toxicité du marqueur.

Ces dernières dépendent du devenir du marqueur dans l'organisme, de sa disponibilité au niveau des tissus cibles dont la structure et la composition sont extrêmement complexes.

Le recours à un modèle *in vivo*, et donc un modèle animal, est alors indispensable. L'imagerie TEP est particulièrement pertinente. Elle permet en effet, grâce à un système de radiomarquage, de mesurer l'interaction du médicament avec sa cible biologique et de suivre sa distribution dans les différentes régions de l'organisme.

L'objectif de notre étude est de mettre au point pour plusieurs marqueurs un protocole d'imagerie TEP capable de révéler leur interaction avec leur cible biologique. L'objectif est de démontrer l'impact de leur utilisation en imagerie spécifique pour le diagnostic précoce et pour l'étude en pharmacodynamique de certains traitements anti tumoraux associés. Aux doses prévues dans cette étude, aucune toxicité ni aucune souffrance ne sont attendues : l'imagerie TEP, technique non invasive, est très sensible et ne nécessite donc pas d'injection importante du marqueur. Pour réaliser les examens d'imagerie TEP, un radiotracer spécifique d'une cible pharmacologique est utilisée. Ces examens sont réalisés chez des animaux « contrôle » ayant reçu un placebo, et chez des animaux ayant reçu le traitement testé à différentes doses.

Sur la base des résultats attendus, le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés, serait de 516 sur la durée de l'étude (c'est-à-dire 5 ans). Ce nombre d'animaux a été calculé (i) pour démontrer les performances diagnostiques des biomarqueurs d'imagerie et (ii) pour mettre en évidence un effet thérapeutique statistiquement significatif. Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole ce qui permet de diminuer l'état de stress et d'améliorer leur bien-être. Ils seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Les animaux seront étroitement suivis tout au long de l'étude, permettant l'application des critères d'arrêt d'expérimentation définis en amont afin d'empêcher toute souffrance animale.

13386 Un rôle causal du stress est suggéré dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. L'hormone de stress est sécrétée plus abondamment chez les patients que des contrôles sains. En excès, l'hormone de stress est associée à des dysfonctionnements physiologiques du cerveau, une neurodégénération ainsi que des troubles cognitifs. Nous proposons d'en étudier les mécanismes qui pourraient expliquer l'étiologie de la maladie. Nous avons développé un nouveau modèle génétique pour bloquer la réponse naturelle de l'hormone de stress qui sera combinée avec un modèle génétique de la maladie d'Alzheimer. Notre objectif est d'exploiter ces modèles en interaction avec l'induction d'une inflammation chronique pour : (1) élucider de nouveaux mécanismes moléculaires, et (2) et tester de nouvelles approches thérapeutiques.

L'objet de la présente demande, qui concerne 214 souris en tout, de souches sauvages ou transgéniques ayant un fond génétique pur C57BL6, consiste en 3 expériences réparties en 16 groupes d'animaux sur lesquels sont pratiquées 3 procédures expérimentales complémentaires. Celles-ci sont l'induction d'une inflammation par le stress ou par une injection de lipopolysaccharide et enfin une technique chirurgicale qui permet l'imagerie non-invasive de traceurs pathologiques.

Des mesures visant à réduire, remplacer et raffiner les expérimentations ont été mises en place :

- 1) nous utiliserons une souche pour laquelle les protocoles de stress et d'inflammation, sont connues, évitant ainsi d'utiliser plus d'animaux que nécessaire pour la réalisation des objectifs
- 2) nous pratiquerons un suivi longitudinal des plusieurs paramètres sur les mêmes souris pour en limiter le nombre tout en gardant la même puissance statistique

Toutes les expériences que nous pratiquerons sur les souris suivront les recommandations du Circor (Guide de l'évaluation éthique) et de la charte pour l'éthique de l'expérimentation animale.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les mesures suivantes seront prises : Les animaux seront opérés sous anesthésie profonde ; après la chirurgie les animaux seront maintenus en atmosphère humide et chauffée jusqu'au réveil. Si les animaux ont perdu du sang pendant la chirurgie, nous administrerons une solution saline en sous cutané. Les animaux seront ensuite stabulés en cage transparente et suivis quotidiennement pour des signes de détresse/infection/souffrance. Un analgésique sera administré dilué dans l'eau de biberons pour

éviter la douleur possible liée à la cicatrisation du site d'injection. Les animaux montrant d'éventuels signes d'infection (écoulement, rougeur ou enflure au niveau de la zone de cicatrisation) seront traités avec des antibiotiques dans l'eau de boisson.

13387 Les maladies rénales affectent 10% de la population mondiale avec une incidence croissante et elles représentent de nos jours un véritable enjeu de santé publique. L'insuffisance rénale terminale (IRCT) est par ailleurs associée à une importante morbi-mortalité cardiovasculaire et à un coût élevé pour la société (environ 4 milliards d'euros par an en France). Les maladies glomérulaires sont la première cause d'IRCT, et le podocyte, une cellule épithéliale en différenciation terminale du glomérule, est la cible et l'acteur principal de ces lésions glomérulaires. Le développement de thérapies ciblées agissant spécifiquement sur le podocyte est donc essentiel afin de contrôler ces maladies glomérulaires. Dans certaines de ces maladies des immunosuppresseurs comme la ciclosporine ou le rituximab ont montré leur efficacité en partie via leur action directe sur le podocyte. Ces données suggèrent qu'il existe des voies de signalisation communes aux cellules immunitaires et aux podocytes qui participeraient à la genèse des lésions glomérulaires comme nous l'avons montré précédemment.

Notre hypothèse principale est donc que la signalisation podocytaire γ C, activée lors de la phase précoce de l'agression glomérulaire, module la différenciation et la survie podocytaires ayant un rôle majeur sur le développement des lésions glomérulaires. Mais les acteurs d'aval ne sont pas connus. L'étude de la voie de signalisation γ C podocytaire et notamment de l'effecteur STAT5 grâce à un modèle *in vitro* et *in vivo* peut donc aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les lésions glomérulaires et permettre de développer des thérapies plus ciblées sur le podocyte.

Les modèles animaux d'atteinte podocytaire (anti-membrane basale glomérulaire ou par injection de doxorubicine) chez les souris génétiquement modifiées (modifications génétiques non délétères) sont un élément essentiel permettant l'étude des voies de signalisation spécifiques à cette cellule épithéliale glomérulaire.

Le nombre d'animaux (n=360) est rationalisé au maximum, en effet par croisement des expériences plusieurs lots d'animaux pourront servir de contrôles à plusieurs autres. Ainsi d'une même série d'expérience pourront être tirées différentes conclusions. Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux et de respecter la règle des "3 R". Afin de garantir le bien-être animal, une surveillance quotidienne et le recours à des analgésiques sont envisagés. De plus, certaines expériences visant à déterminer les mécanismes moléculaires seront réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires podocytaires pour limiter le recours à l'animal. Les objectifs de ce projet sont de déterminer les rôles d'une signalisation podocytaire au cours de la pathologie rénale. Il nous faut donc pouvoir à la fois manipuler la cellule podocytaire et son environnement proche avec lequel il interagit au cours d'un modèle pathologique ne pouvant pas être reproduit *in vitro*.

13388 La disponibilité est très importante car elle détermine la quantité de substance qui va pénétrer dans l'organisme. Elle dépend principalement du mode d'administration et du type de substance ou de médicament. Il existe de façon simplifiée deux grandes voies d'administration : la voie digestive et toutes les autres.

La voie digestive ou entérale correspond à la voie orale. Lorsqu'on avale un comprimé, il arrive dans l'estomac et sa digestion va commencer : le comprimé se délite, se désagrège et se dissout. Une partie du principe actif peut commencer à passer à travers la paroi de l'estomac pour rejoindre la circulation sanguine, une autre continue sa route dans l'intestin avant d'être absorbé pour rejoindre la circulation sanguine. Avant que le principe actif ne se répartisse dans tout le corps pour y exercer son action, il va passer par le foie et y être en partie transformé voire éliminé : il s'agit de l'effet de "premier passage hépatique".

La voie parentérale regroupe toutes les autres voies : les injections (intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée), la voie transcutanée (patches, pommades), la voie perlinguale (granules à laisser fondre sous la langue), la voie rectale (suppositoires), etc. Par ces voies, le principe actif atteint la

circulation sanguine, se répartit directement dans la circulation sans subir l'effet de premier passage hépatique. On dit que le principe actif est plus biodisponible que par voie orale : la vitesse d'action ou la quantité de médicament qui agit (ou les deux) est plus importante.

Une fois passé dans le sang, le médicament va se répartir de manière uniforme dans tout l'organisme. Cette étape est appelée la distribution et le médicament touche ainsi les différentes parties du corps pour atteindre sa cible. Une fois la cible atteinte, il exerce son action. La cible peut être un type particulier de cellule, le foyer d'une infection, ...

Définition du projet : L'objectif de ce protocole expérimental est de mener à bien l'évaluation de la disponibilité dans le sang d'un composé après son administration.

Justification du recours à l'expérimentation animale : Le recours au petit animal est obligatoire dans ce type d'approche car il n'existe pas encore de modèles cellulaires ou en tube à essai supplétifs, permettant de mimer tous les éléments complexes (digestion, filtration par le foie, liaison à des protéines sériques...) qui influencent la disponibilité.

Règle des 3 R : Lorsque cela sera possible nous chercherons à remplacer cette expérimentation par une approche sur cellule. L'expérimentation prévue ne doit pas induire de douleur. Le personnel en charge de l'expérimentation est formé et sensibilisé à détecter les signes de détresse. En cas de détection de tels signes une analgésie pourra être pratiquée par anesthésie ou utilisation d'anti-inflammatoires. De plus afin de limiter le stress, les animaux seront acclimatés aux manipulations avant de démarrer l'expérimentation et leur environnement sera enrichi. Nous avons également prévu d'utiliser le nombre minimal d'animaux nécessaire au traitement statistique des résultats afin de réduire leur utilisation.

Nombre d'animaux utilisés: Dans le cadre de ce protocole il est prévu d'utiliser 18 animaux par an soit 90 animaux sur les 5 ans.

13389 Les troubles du rythme cardiaque sont un problème majeur de cardiologie. Grâce aux progrès récents de la génétique, on découvre actuellement de nouvelles mutations génétiques et de nombreux variants responsables de formes d'arythmies incomprises et résistantes aux traitements courants. Ce projet a pour objectif de caractériser les effets fonctionnels intégrés (in-vivo) d'une mutation affectant le gène SCN5A codant pour le canal sodique « cardiaque » (Nav1. 5). Des données cliniques chez l'homme suggèrent que la mutation R2019H engendrerait une cardiomyopathie dilatée. Trois groupes (contrôle, hétérozygote mutation Nav1. 5/R2019H, homozygote mutation Nav1. 5/R2019H) seront utilisés pour comparaison dans un contexte de cardiomyopathie dilatée comme suggéré par l'effet de la mutation chez des patients humains. La règle des 3R s'applique dans le cadre global de notre étude. En terme de Remplacement, la majeure partie des études nécessaires à la caractérisation des effets moléculaires et cellulaires de la mutation a été réalisée in-vitro ; ce qui a permis de ne pas utiliser d'animaux à ce jour. Nous avons utilisé des cellules en culture ; ce qui nous a permis de comprendre les mécanismes et de limiter très fortement les investigations chez l'animal. Suite aux avancées obtenues in-vitro, il est maintenant indispensable de valider les effets de la mutation in-vivo dans un modèle expérimental pour évaluer la fonction cardiaque intégrée. Il s'agira en l'occurrence de réaliser des approches très peu invasives et indolores (électrocardiogramme, échocardiographie) pour comparer le phénotype avec les symptômes de la pathologie humaine et une meilleure transposition vers la clinique. Il n'existe actuellement aucune méthode (in-vitro ou in-silico) permettant de prédire à coup sûr l'impact d'effets moléculaires au niveau d'un organisme entier. Lors de cette étude et dans un souci de Réduction, chaque animal sera également utilisé, après sacrifice selon les règles en vigueur, pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires). Dix (10) souris seront au final utilisées par groupe (soit 30 souris au total). Raffinement : l'intervention chirurgicale, consistant à implanter les capteurs de télémétrie, est réalisée sous anesthésie et analgésie pré et post opératoire. Elle sera réalisée au moment de l'enregistrement échocardiographique. Les souris seront hébergées dans un milieu permettant de répondre à leurs besoins physiques et comportementaux (enrichissement du milieu).

13390 Mot clés: syndrome de détresse respiratoire aiguë, monitoring respiratoire.

L'objectif de ce projet de recherche translationnelle d'une durée d'un an est de valider une technique de mesure du volume pulmonaire de fin d'expiration (VPFE) par une technique non-invasive sur un modèle expérimental de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Le SDRA est le plus souvent secondaire à une infection, et se traduit par une insuffisance respiratoire aiguë. Le SDRA est relativement fréquent (10% des admissions en réanimation), avec une mortalité élevée (entre 40 et 50%). Les bases du traitement sont de traiter la cause et la ventilation mécanique avec une pression expiratoire positive (PEP), qui permet d'assurer une oxygénation sanguine suffisante en maintenant les alvéoles pulmonaires ouvertes. Toutefois, des réglages inadaptés de la ventilation mécanique sont responsables d'une surmortalité dans cette pathologie, et on manque de moyens fiables et non-invasifs pour assister aux réglages du respirateur. La mesure du VPFE pourrait permettre de mieux régler le respirateur au cours du SDRA.

Une étude animale a antérieurement démontré que les valeurs de VPFE étaient relativement fiables (en comparaison avec le scanner), mais que cette fiabilité était moindre à mesure que le niveau de PEP augmentait.

L'objectif de ce travail est d'évaluer une évolution de la technique de mesure du VPFE, dont on espère une amélioration de la fiabilité. Si elle était démontrée, ceci permettrait de mieux régler le respirateur au cours du SDRA, avec l'objectif de réduire l'agression pulmonaire induite par la ventilation mécanique, et donc de diminuer la durée de ventilation et in fine la mortalité du SDRA.

Il est prévu d'utiliser 15 porcs au maximum compte-tenu d'un nombre de décès prématuré (lors de la genèse du SDRA expérimental) attendu de 30-50% (10 porcs avec données complètes sont requis).

Les 3 R seront respectés de la façon suivante.

1. Remplacement Un modèle animal doit être utilisé car il n'est pas possible de valider la technique chez l'homme car le nombre de scanner requis est responsable d'une irradiation qui serait inacceptable pour les patients. Il n'existe pas à ce jour d'alternative non humaine, non animale pour simuler un SDRA.

2. Réduction Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum dans la mesure ou avec 7 mesures par animal (nombre maximal compte-tenu des contraintes liées à la disponibilité du scanner), une précision de ± 50 ml sur l'estimation du VPFE sera obtenue. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux aboutirait à une précision moindre et au risque de ne pas permettre de conclure sur la fiabilité de la technique.

3. Raffinement

Le choix du porc comme modèle expérimental repose sur le fait qu'il s'agit d'une espèce à la fois anatomiquement et physiologiquement proche sur le plan respiratoire des primates et de l'Homme. De plus, la morphométrie (volume pulmonaire) de l'animal permet l'utilisation de la même technique de ventilation (respirateur artificiel) et d'imagerie (scanner X) que chez l'homme.

La totalité du protocole est réalisée sous anesthésie générale profonde incluant des morphiniques puissants (il s'agit des mêmes médicaments utilisés chez l'homme lors des chirurgies lourdes ou lors du SDRA). Le SDRA expérimental est réalisé par inhalation de sérum physiologique réchauffé à 37°C alors que l'animal est comateux et puissamment analgésié et ce jusqu'à la fin du protocole. La procédure expérimentale est classée en sévérité sans réveil, l'anesthésie et les doses utilisées font que l'animal ne ressentira aucune douleur, il sera mis à mort en fin d'expérience par surdose anesthésique car l'atteinte respiratoire est incompatible avec la survie sans ventilation mécanique.

13391 Malgré des progrès remarquables en matière de prévention et de traitement, le cancer reste une cause majeure de mortalité dans le monde. Depuis quelques années, notre groupe est spécialisé dans le développement de stratégies de chimiothérapies sélectives ciblant les cellules tumorales. Les vecteurs anticancéreux que nous développons véhiculent un médicament vers la tumeur sous une forme non-toxique. Dans ce contexte, notre groupe s'est spécialisé dans le développement d'agents anticancéreux capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance

d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral ou de récepteurs présents à la surface des cellules tumorales. Ces stratégies ont été validées *in vitro* sur des cellules en culture mais aussi *in vivo* chez des souris.

Dans ce projet, nous souhaitons administrer chez la souris un transporteur chimique, capable d'interagir avec un médicament anticancéreux couramment utilisé en clinique (la doxorubicine), pour réduire ses effets secondaires et faciliter son transport jusqu'à la tumeur afin d'y exercer tout son potentiel thérapeutique. Ainsi ce transporteur pourrait réduire les effets secondaires rencontrés chez les patients traités avec la doxorubicine en ciblant l'action de cette molécule sur la zone à traiter.

Pour mener à bien cette étude, nous réaliserons une seule procédure expérimentale pour un total de 160 souris. La stratégie de transport de la doxorubicine par notre transporteur chimique a déjà été validée *in vitro* sur des modèles de culture cellulaire. Afin de connaître le potentiel de cette stratégie, il est à présent obligatoire de transposer ce concept sur des modèles animaux. Afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Par ailleurs, en cas d'apparition de douleurs chez les animaux une administration d'analgésique (buprénorphine) sera réalisée. Afin de pouvoir étudier notre stratégie thérapeutique chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer). Comme mentionné plus haut, la stratégie de ciblage des tumeurs a déjà été validée par notre laboratoire lors d'études préliminaires. Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique, la « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 5 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner).

13392 La Glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est une maladie rare considérée comme un modèle de maladie auto-immune spécifique d'organe qui atteint les glomérules rénaux, principale unité de filtration du sang et de formation de l'urine. Elle est déclenchée par la fixation d'anticorps à des constituants de la membrane basale glomérulaire conduisant à une cascade d'évènements dont l'activation dérégulée du système du complément entraînant des lésions glomérulaires et une perte de fonction du rein.

L'objectif du projet est de déterminer l'efficacité d'un anticorps anti-C5 dans le traitement de la glomérulonéphrite extramembraneuse (GEM), cause majeure de fuite protéique urinaire chez l'homme et d'insuffisance rénale. En effet, Les anticorps anti-C5 (éculizumab) ont été utilisés dans la GEM humaine mais avec peu d'efficacité car la dose était insuffisante en raison de la fuite urinaire de l'anticorps. Il est nécessaire de revenir au modèle expérimental pour confirmer l'efficacité de l'anti-C5 et faire une étude de dose. Nous utiliserons le modèle de la néphrite de Haymann chez le rat qui reproduit fidèlement la forme humaine de la maladie après injection d'un anticorps dirigé contre un antigène du podocyte. Les procédures sont élaborées suivant le principe des 3R : Le recours au rat est nécessaire pour étudier l'évolution de la maladie, le rat étant la seule espèce à développer une GEM après injection d'anticorps anti-podocyte. Nous estimons à 82 rats le nombre d'animaux nécessaires pour répondre à nos questions portant sur les effets préventifs et curatifs de l'éculizumab. Comme chez l'homme, l'apparition de la maladie n'engendre pas de douleur et d'inconfort mais l'induction de la maladie chez l'animal induit une douleur qui est prise en compte par l'administration d'antalgique et une surveillance renforcée durant cette période. Les conditions d'hébergement et d'enrichissement du milieu sont également prises en compte dans le respect de la réglementation et du bien-être animal.

13393 Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une diminution progressive de la vision puis une cécité. Dans ces dernières études,

l'équipe a isolé d'une plante, *Uvaria Chamae*, un extrait actif (qu'elle a appelé la *geralexin*) qui a un effet protecteur sur les photorécepteurs à cône par stimulation de la glycolyse aérobie. Des expériences qu'elle a menées, ont montré que cette stimulation passe par des mécanismes indépendants de celui actuellement connu (couple RdCVF/BSG1). De ce fait, l'équipe a cherché à identifier un gène codant pour une enzyme glycolytique et exprimé dans les photorécepteurs. Par criblage génétique, l'équipe a identifié la PFKFB2 comme pouvant être l'enzyme cinétiquement déterminante dans le mécanisme de glycolyse évoqué ci-dessus.

Après avoir prouvé que PFKFB2 est exprimé majoritairement dans les cônes (phase 1) et afin de confirmer le rôle de ce dernier dans les mécanismes de protection des photorécepteurs à cônes, nous allons étudier le phénotype d'animaux déficients en PFKFB2 (phase 2a).

La protéine bi-fonctionnelle PFKFB2 intervient dans la glycolyse des photorécepteurs à cône. A l'aide du système *loxP/cre*, nous avons ciblé et tronqué spécifiquement *pfkfb2* dans les cônes.

La rapamycine permet d'inactiver la voie mTOR qui est une kinase intervenant dans la régulation du métabolisme cellulaire, notamment au niveau de la régulation cellulaire de l'insuline. Si les résultats de la phase 2a ne sont pas concluants, l'administration par biberonnage de la rapamycine va permettre de diminuer le taux d'insuline ce qui entrainera une diminution de la survie des cônes (phase 2b). La diminution du nombre de cône ainsi que l'absence de PFKFB2 dans les cônes survivants devraient nous permettre de conclure quant au rôle de PFKFB2 dans la glycolyse et son implication dans la survie des photorécepteurs à cônes.

Si nous obtenons le phénotype attendu (dégénérescence des photorécepteurs) nous tenterons de restaurer la vision de ces animaux par injection de PFKFB2 à l'aide d'outils viraux (phase 3). Enfin, nous testerons cette thérapie sur un modèle de souris de la rétinopathie pigmentaire, les souris *rd10* (phase 4). Le processus dégénératif au niveau de la rétine sera analysé par OCT et MICRON et l'activité visuelle des animaux sera évaluée par un électrorétinogramme. En fin de projet, après euthanasie de l'animal, les rétines seront récupérées pour analyses histologiques et la densité des cônes sera ensuite évaluée.

L'ensemble de ses expérimentations nous permettra de confirmer le rôle de PFKFB2 dans les mécanismes de glycolyse initiés par la *geralexin*.

Au total 538 animaux seront nécessaires à cette étude (contrôles inclus). Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'apprécier la restauration visuelle, ce qui explique l'utilisation du modèle murin.

Les souris bénéficieront d'une anesthésie pour certaines procédures et seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries pour s'assurer de leur bien-être. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée.

Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

13394 Les vaisseaux sanguins permettent l'oxygénation et la nutrition des organes. La formation des vaisseaux sanguins (l'angiogenèse) joue un rôle clé au cours de la croissance mais s'arrête à l'âge adulte sauf au cours du cycle ovarien ou de la grossesse. Elle peut cependant être réactivée dans diverses conditions pathologiques telles que le cancer ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ainsi que dans des maladies génétiques touchant des gènes contrôlant la maintenance de l'architecture du réseau sanguin telles que la maladie de Rend-Osler. Les mécanismes de développement de cette maladie sont encore mal connus mais une de ses graves complications est l'apparition de malformations artérioveineuses (MAVs) dans lesquelles les artères et les veines rentrent directement en contact sans passer par un lit capillaire, ce qui fragilise les vaisseaux. Les mutations responsables de la maladie de Rendu-Osler touchent un gène codant le récepteur cellulaire ALK1 essentiel au développement des vaisseaux et qui est normalement activé par les protéines BMP9 et BMP10. Notre étude vise à déterminer les fonctions respectives de BMP9 et BMP10 dans le développement des vaisseaux et si la perte de ces ligands peut conduire à la formation de MAVs similaires à celles observées dans la maladie de Rendu-Osler.

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut remplacer un organisme vivant pour mener cette étude. Le recours à des investigations *in vivo* est donc nécessaire. Des souris transgéniques déficientes en BMP9, ou en BMP10, ou doublement déficientes en BMP9-10 ont été générées. Ces animaux permettront d'étudier l'angiogenèse dans différents tissus de l'organisme : la rétine dont l'angiogenèse est très bien caractérisée et des organes très vascularisés en croissance (poumons, foie, coeur, cerveau).

Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. L'étude inclut le nombre d'animaux nécessaires, mais suffisants pour répondre aux exigences d'un test statistique qui sera appliqué pour chaque paramètre qui sera observé. Sur chaque animal, les rétines, les poumons, le coeur et le foie seront prélevés après euthanasie et permettront (1) une visualisation de la vasculature globale par des techniques de microscopie (2) des analyses d'expression de gènes et de protéines suite à l'inactivation de BMP9 et/ou BMP10. Une autre procédure ciblera spécifiquement la formation des MAVs qui seront recherchées. Aucun prélèvement ne sera effectué sur animal non euthanasié. Nous avons estimé que 324 animaux seront nécessaires, le nombre d'animaux par groupe ayant été déterminé sur la base des données de la littérature. Chaque groupe d'animal pourra servir à plusieurs prélèvements chaque fois que cela est possible.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience qui est de courte durée, les animaux étant euthanasiés au plus tard 7 jours après la naissance. Néanmoins, des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, pour lesquels il sera décidé de mettre en œuvre une euthanasie.

13395 Contexte :

Le projet a pour but de d'évaluer l'efficacité d'un médicament destiné au chien contre une pathologie canine donnée.

Pour qu'un médicament soit autorisé, il faut notamment démontrer que celui-ci apporte un effet bénéfique sur l'animal pour la pathologie considérée. Les études sont réalisées sur l'espèce cible (chien) pour s'approcher au mieux des conditions réelles d'utilisation (Pharmacopée Européenne et réglementations des pays destinataires).

Pour démontrer l'efficacité d'un médicament contre cette pathologie canine, une phase d'épreuve suit la phase d'administration de ce médicament. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène cible pour reproduire expérimentalement la pathologie.

Objectifs :

Pour chaque pathologie considérée, les objectifs du projet sont à l'optimisation du modèle d'épreuve et b) l'évaluation de l'efficacité du médicament chez le chien lors de l'épreuve.

Pour certaines pathologies, une étude d'amplification *in vivo* sur chiens de la souche d'épreuve (passage en série de la souche sur plusieurs chiens) peut être nécessaire pour obtenir une souche utilisable dans une épreuve expérimentale.

Avantages et dommages :

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques provoquant une gêne ou une douleur chez l'animal. Par ailleurs l'administration du médicament, du pathogène et les prélèvements peuvent générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés. De plus, des points limites spécifiques à chaque pathologie sont appliqués.

L'intérêt final de ces études est de permettre le développement de médicaments efficaces contre les maladies ciblées et donc de réduire l'impact des maladies infectieuses chez les chiens.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique du médicament testé, les exigences réglementaires et des projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 1825 chiens.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un médicament consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre de candidats à tester *in vivo* donc le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Lorsque les modèles existent, un premier test sur des espèces alternatives (notamment des rongeurs) est réalisé afin de réduire le nombre de chiens utilisés.

Le recours à l'espèce cible est à l'heure actuelle indispensable d'un point de vue réglementaire et scientifique, les résultats obtenus *in vitro* et sur espèces alternatives n'étant pas complètement extrapolables.

Réduction : Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chiens tout en permettant d'interpréter les résultats des études.

Raffinement :

Des points limites spécifiques à chaque pathologie ont été définis afin de limiter le plus précocement possible la douleur des animaux. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie et une analgésie peuvent être réalisées lors de certains actes si nécessaires.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Dans la majorité des cas, tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux.

13396 Avec la modification de l'alimentation et du style de vie, une constante augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 est observée. En France, la prévalence globale du diabète était estimée à 4,6 % de la population en 2011. Ce diabète de type 2 est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique. Cette dernière est généralement associée à des lésions vasculaires qui sont notamment à l'origine d'infarctus du myocarde, d'AVC ou encore d'artérite des membres inférieurs. Ces altérations sont généralement expliquées par une augmentation du stress oxydant conséquence de l'hyperglycémie chronique. Or, des travaux récents ont pu mettre en évidence dans d'autres tissus (Rein, Cœur) la présence de transporteurs du glucose (cotransporteurs glucose/sodium dépendant, SGLT), jusque-là ignorés, activés par une augmentation du glucose et responsables très probablement d'une activité oxydante associée à l'hyperglycémie. En effet, nos travaux précédents ont permis de mettre en évidence l'implication du stress oxydant dans les effets délétères de l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale dans différents lis vasculaires et ont démontré que les effets chez l'homme étaient retrouvés chez le rat Néanmoins, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée au potentiel rôle de ces transporteurs SGLT dans la physiopathologie vasculaire associée à l'hyperglycémie.

1. Dans un premier temps nous testerons sur un modèle de cellule HUVEC les effets de différents sucres, propres à chaque transporteur du glucose (GLUT ou SGLT), afin de sélectionner les plus pertinents pour une étude chez l'animal. Suite à cela nous réaliserons une évaluation des sucres sélectionnés sur un modèle de rat Wistar males sédentaires. Un premier protocole *in vivo* sera effectué pour l'évaluation des effets de l'hyperglycémie sur la pression artérielle et la microcirculation et sera suivi par une évaluation ex-vivo sur aortes isolées permettant d'évaluer l'intégrité des différents tissus vasculaires et leur fonction vasomotrice. Les aortes permettront également l'évaluation de l'expression et de l'activité de différentes protéines. Pour les procédures *in vivo*, nous réaliserons différents tests oraux de tolérance au glucose durant lesquels la pression artérielle ou la microcirculation pourront être mesurées. Cette première série portera donc sur

l'étude des effets délétères de l'hyperglycémie ; l'implication du stress oxydant et des différents transporteurs du glucose. Par ailleurs ce groupe de rat sédentaire sera comparé à un groupe de rats entraînés (n=20 pour chacun des 2 groupes). Les 2 groupes seront hébergés simultanément et pour la même durée dans l'animalerie. Cependant le groupe de rats entraînés effectuera 5 jours par semaine de l'activité physique sur tapis roulant alors que les rats sédentaires seront maintenus dans leur cage.

2. Enfin nous étudierons les effets provoqués par l'ingestion d'édulcorants. En effet une solution proposée par l'industrie agro-alimentaire, depuis de nombreuses années, afin de remplacer le sucre potentiellement délétère est de remplacer celui-ci par des édulcorants sans valeur nutritive. Néanmoins, il existe une controverse importante sur les effets d'une consommation d'édulcorants sur la santé humaine chez des personnes en bonne santé ou des patients atteints de pathologies cardiométaboliques. Afin de tester les effets de ces édulcorants nous utiliserons un second lot de rat (n=45). Ces rats seront soumis à un régime de 8 semaines avec une nourriture classique d'animalerie et de l'eau qui sera soit sans ajout pour le groupe contrôle soit avec du sucrose, soit avec des édulcorants (Sucralose + ACK) (n=15 par groupe). Les tests réalisés seront identiques à ceux décrits lors de la première partie.

Si l'on additionne les différents protocoles cette étude portera sur un total de 85 rats Wistar.

Afin de respecter la règle des 3R, l'utilisation préalable d'expérimentation sur cellules HUVEC nous permettra de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires pour caractériser l'activité des différents transporteurs du glucose. Enfin, le modèle d'aortes isolées dans des cuves à organe permet de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires en comparaison avec un système de perfusion artérielle *ex vivo*, puisqu'il nous permet de tester 8 conditions différentes sur une même artère. Pour réduire le stress, les animaux sont placés par groupe de 3 individus et acclimatés à leurs conditions d'hébergement pendant les 2 semaines suivant leur arrivée. Des igloos et tubes, ainsi que du coton sont mis à leur disposition dans les cages afin d'enrichir leur environnement. Par ailleurs, La réalisation du protocole d'exercice est effectuée sous la surveillance permanente de l'expérimentateur et un point limite d'arrêt de la course est fixé lorsque l'on voit que l'animal n'arrive plus à suivre le rythme, stationne sur la grille électrique plus de 10 secondes ou qu'il reste immobile quand on le remet en cage. Enfin afin de réduire au maximum la souffrance le prélèvement des organes est réalisé sur animal anesthésié avec une surdose de doléthal injectée en intra-péritonéal (0.15ml/100g de poids).

13397 Ce projet se situe dans le domaine de la recherche expérimentale en neurosciences et vise à étudier les liens entre les récepteurs à la sérotonine de type 4 (5-HT₄R) et les troubles de la mémoire observés dans de nombreuses pathologies du système nerveux central, comme les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et les maladies psychiatriques (dépression, schizophrénie). Ces troubles altèrent considérablement la qualité de vie des personnes qui en sont atteints et demeurent malheureusement résistants aux stratégies thérapeutiques actuelles. La stimulation des 5-HT₄R par des molécules appelées agonistes semble être une stratégie prometteuse pour lutter contre ces troubles de la mémoire. En effet, ces récepteurs sont largement présents au niveau des structures cérébrales impliquées dans les processus de mémorisation, telles que l'hippocampe. Des données internes au laboratoire et issues de la littérature ont déjà démontré les effets bénéfiques sur la mémoire de l'administration d'agonistes des 5-HT₄R chez l'animal. Ces effets ont été confirmés chez l'Homme lors d'une étude datant de 2018.

Il est de nos jours bien établi que les processus mnésiques au niveau de l'hippocampe sont supportés par des modifications adaptatives et durables de l'efficacité de la communication entre les neurones appelée plasticité synaptique. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant les effets promnésiants des molécules agonistes des 5-HT₄R, notre projet vise à étudier, par une approche d'électrophysiologie extracellulaire *ex vivo*, les modifications de plasticité synaptique induites par ces traitements pharmacologiques au niveau de l'hippocampe de souris, en condition basale ou en condition de plasticité synaptique altérée.

Les études seront menées d'une part, chez la souris sauvage C57BL/6JRj en condition normale ou en condition de plasticité altérée par des agents pharmacologiques, et d'autre part chez un modèle

murin transgénique mimant certains aspects de la pathologie Alzheimer (5xFAD) – maladie pour laquelle les patients présentent des troubles de la mémoire.

Au cours de ce projet, 350 souris seront donc nécessaires ; 240 souris de souche C57BL/6JRj et 110 souris de souche 5xFAD. Afin de répondre au mieux aux conditions d'éthique et pour satisfaire la règle des « 3R », les tests seront réalisés sur des groupes de n=10 souris permettant l'application de tests statistiques avec une puissance adaptée aux analyses électrophysiologiques. Les administrations sont considérées comme des procédures de classe légère et seront réalisées avec soin par un personnel qualifié. Par ailleurs, les prélèvements d'hippocampe seront effectués après anesthésie suivie d'une dislocation cervicale puis décapitation afin d'éviter toute souffrance à l'animal.

L'objectif final de ce projet est de pouvoir valider les 5-HT4R comme cible thérapeutique de choix contre les déficits mnésiques communs à de nombreuses pathologies neurologiques.

13398 Lors du développement d'un nouveau médicament à usage humain, il est indispensable de connaître ses propriétés pharmacologiques et son comportement dans un organisme vivant.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule ou d'une combinaison de nouvelles molécules chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. L'utilisation du modèle primate se justifie par la spécificité des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez eux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiologiques chez l'Homme. Ceci est particulièrement vrai pour les médicaments qui ont pour objectifs de traiter des affections du Système Nerveux Central (SNC). De plus, les procédures de ce projet permettront d'établir une stratégie de prédiction de la biodisponibilité de chaque molécule et/ou d'évaluer leurs effets dont la finalité est d'ajuster la dose administrable à l'Homme.

Réduction:

Durant la période couverte par ce projet, il est prévu d'utiliser 50 macaques cynomolgus par an (soit un total de 250 pour 5 ans), 10 vervets par an (soit un total de 50 pour 5 ans) et 10 macaques rhésus par an (soit un total de 50 pour 5 ans). Ces animaux seront tous issus d'un élevage agréé. Pour chaque procédure réalisée, il sera veillé à utiliser un nombre minimal et suffisant d'animaux pour que les résultats soient interprétables et transposables à l'Homme.

Raffinement :

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel est entièrement formé à la réalisation des actes spécifiques sur le modèle PNH. Le vétérinaire est garant du bien-être des animaux.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse et de le prendre en charge. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements ainsi qu'entre les administrations de la ou des molécule(s) étudiée(s). Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront déterminées au préalable de la réalisation de chaque procédure. Ceci sur la base des données préliminaires recueillies sur la molécule et ses effets. Des points limites seront définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux, lorsque possible et une attention particulière sera accordée à l'enrichissement de leur milieu de vie. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations. Dans le cas où les animaux feront l'objet d'une réutilisation, un avis vétérinaire sera obligatoire pour justifier du bon état de santé de l'animal.

13399 La thérapie génique des maladies génétiques rares est une stratégie innovante et pertinente consistant à transférer un acide nucléique dans les cellules malades afin de traiter les patients. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAVr permettait une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Néanmoins, il a été observé qu'une réponse immunitaire cytotoxique dirigée contre le produit du transgène pouvait empêcher l'efficacité du transfert de gène notamment en éliminant la totalité des cellules transduites.

De façon intéressante, nous avons montré récemment chez le primate que la réponse immunitaire cytotoxique dirigée contre le produit du transgène après transfert de gène à l'aide d'AAVr pouvait être non conventionnelle : en effet, nous avons mis en évidence la présence de cellules immunitaires immunorégulatrices au niveau de certains tissus injectés entraînant la persistance de génomes viraux et/ou une expression à long terme du produit du transgène. Cette réponse immune pourrait varier en fonction du mode d'administration de l'AAVr, la dose injectée, le tissu ciblé... Afin de mieux comprendre comment ces mécanismes d'immunorégulation se mettent en place il semble pertinent de réaliser les futures expériences chez un modèle animal alternatif au modèle primate notamment pour des raisons éthiques et pour pouvoir constituer des groupes suffisamment larges. L'objectif de ce projet est donc de vérifier si la réponse non conventionnelle décrite dans le modèle primate après transfert de gène peut être aussi observée dans un modèle murin.

Le projet prévoit d'inclure 187 souris mâles réparties en cinq groupes :

-Groupe 1 : n=54 souris recevront par voie loco régionale (LR) un AAVr comportant un transgène sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique. 3 doses de vecteurs seront utilisées et les souris seront sacrifiées à 3 temps différents après l'injection (soit 9 cohortes de 6 souris).

-Groupe 2 : n=54 souris, groupe identique au groupe 1, mais le vecteur sera injecté par voie intraveineuse (IV)

-Groupe 3: n=54 souris, groupe identique au groupe 2 mais en utilisant un transgène sous le contrôle d'un promoteur foie spécifique.

-Groupe 4 : 18 souris servant de contrôles négatifs recevront en IV ou par voie LR du tampon de formulation. Ces souris seront sacrifiées à 3 temps différents (n=3 par groupe).

-Groupe 5 : 7 souris seront utilisées pour maîtriser techniquement les différentes procédures, notamment l'injection par voie LR.

Les protocoles envisagés comme l'administration d'AAVr, sont des procédures déjà réalisées dans des modèles murins avec une bonne tolérance générale. Une courbe de poids hebdomadaire ainsi qu'une inspection visuelle quotidienne des animaux seront réalisées. Tout signe clinique notable sera suivi par l'expérimentateur. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place selon les procédures d'injection. Des prélèvements sanguins se dérouleront sous anesthésie gazeuse de courte durée (environ 10min). Les souris seront euthanasiées sous anesthésie gazeuse et analgésie à 10 jours, 30 jours et 6 mois post-injection. Le nombre d'animaux par groupe (n=6) est le minimum nécessaire pour assurer la reproductibilité et l'analyse des résultats par tests statistiques.

13400 Le but de ce projet est de raffiner la recherche expérimentale en proposant des animaux avec un statut sanitaire correct. Un statut sanitaire non maîtrisé entraîne une sur-utilisation d'animaux lors des expérimentations, l'autre aspect est la réduction des animaux utilisés pour entretenir les lignées d'animaux génétiquement altérées (OGM et Mutant). Nous proposons pour cela plusieurs méthodes afin de parvenir à raffiner et /ou à réduire le nombre d'animaux dans les élevages, mais aussi pour d'autres finalités tel que l'expérimentation.

Pour cela nous utilisons plusieurs méthodes dont la finalité est la sauvegarde de souches sous forme respirante ou congelée dans un but d'expérimentation scientifique mais aussi dans le maintien des élevages au plus bas nombre.

La Décontamination par transfert d'embryons et réimplantation après décongélation

Les lignées de souris transgéniques ou mutantes sont décontaminées par transfert d'embryons. Le transfert consiste à prélever des embryons au stade préimplantatoire sur des souris contaminées et de les réimplanter dans l'oviducte de femelles pseudo gestantes

Mâles vasectomisés

On rend stérile par vasectomie (ablation du canal déférent permettant la dissémination des spermatozoïdes après éjaculation), un groupe de mâles afin de produire des femelles pseudo gestantes nécessaire à la réimplantation des embryons.

La Super ovulation

Méthode classique pour optimiser l'obtention d'un grand nombre d'embryons par l'injection en intra péritonéale de 2 hormones à 48h d'intervalle sur des femelles de rongeurs.

La Greffe d'ovaires

Procédure chirurgicale permettant la réimplantation mono latérale d'un greffon d'ovaire frais ou congelé de souris transgéniques, mutantes ou non Cette technique permet de sauver et maintenir l'élevage de lignées Tg ou mutantes. Mais aussi de réduire fortement les stocks d'animaux en élevage lors du simple maintien de lignées. Ce projet est aussi innovant dans le contexte de la réduction d'animaux, en effet nous réutilisons ces animaux en fin d'expérimentation. Il en est de même pour les femelles pseudo gestantes et les mâles vasectomisés ;

Pour les procédures chirurgicales les animaux sont anesthésiés et analgésiés. Un soin particulier est mis en œuvre sur le suivi des animaux dans la phase de réveil et jusqu'à ce que l'on s'assure qu'il n'y est aucun signe clinique.

En se basant sur nos études précédentes, qui ont permis d'optimiser la quantité d'animaux à utiliser, 4340 souris seront nécessaires pour réaliser les 4 projets et produire des résultats fiables. Les animaux sont hébergés dans le plus haut confinement sanitaire (isolateur) ou en portoirs ventilés. L'enrichissement proposé est toujours adapté à ces animaux (maisons rouges, plaquette de cotons...) cette approche permet d'optimiser l'élevage des petits après la naissance, jusqu'au sevrage. Il est aussi adapté pour réduire le problème de cannibalisme.

13401 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie du poumon létale sans traitement capable de renverser sa progression. La FPI est caractérisée par l'activation de cellules qui communiquent entre elles de façon aberrante, ce qui favorise un phénomène de remodelage du tissu pulmonaire, qui conduit à une insuffisance respiratoire fatale. Les protéines de choc thermique (HSP) sont impliquées dans le développement de la maladie. L'une d'entre elles en particulier, HSPB5, est surexprimée dans les poumons des patients souffrant de fibrose pulmonaire. C'est pourquoi des tests *in vitro* ont évalué l'efficacité d'un grand nombre d'inhibiteurs de cette molécule à limiter les mécanismes à l'origine de la maladie.

Notre hypothèse est que ces molécules pourraient inhiber le développement de la fibrose pulmonaire. Pour tester cette hypothèse, nous voulons étudier:

- 1) la toxicité éventuelle de ces molécules *in vivo*
- 2) les effets de ces inhibiteurs sur le développement de la fibrose induite expérimentalement chez la souris.

La première étape de ce projet nécessite de tester chez des animaux non malades une gamme de concentrations de chacun des inhibiteurs, administrés par 2 voies d'administrations différentes.

Les résultats de cette étape initiale nous permettront de sélectionner les inhibiteurs et les doses qui pourront être testés sur le modèle de fibrose induite chez la souris.

Notre modèle sera basé sur l'injection d'un agent anti-cancéreux, la bléomycine chez la souris. Ce modèle de fibrose pulmonaire est le plus utilisé et reconnu dans la communauté scientifique.

Ce projet nécessitera 3300 souris (C57Bl6/N) et se déroulera sur 4 ans.

Nous utiliserons une stratégie suivant la règle des 3R. Tous les tests de caractérisation des composés, réalisables sur cultures cellulaires seront faits. Cependant, la complexité du poumon et du phénomène de fibrose qui fait intervenir plusieurs processus (inflammation, remodelage

tissulaire) rend indispensable l'étude sur animal entier. Nous réduirons le nombre d'animaux au minimum requis pour remplir les conditions des tests statistiques. Nous raffinerons nos expérimentations en utilisant une technologie avancée et validée pour l'administration des molécules testées, et permettant de produire des données les plus pertinentes possibles tout en réduisant l'inconfort des animaux. Une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux (densité par cage, enrichissement du milieu). Les souris auront accès à une alimentation enrichie pour limiter la perte de poids et la déshydratation qui caractérisent le modèle. Nous utiliserons des points limites précoces permettant d'éviter une souffrance susceptible d'avoir une incidence grave sur l'état général des animaux. Le modèle de fibrose pulmonaire sera appliqué par du personnel qualifié et entraîné.

13402 Les maladies parasitaires liées aux vers parasites touchent aussi bien l'Homme que les animaux. L'impact de ces vers parasites sur la santé animale est significatif puisqu'ils sont responsables de symptômes cliniques de type perte de poids, anémie, diarrhée voire la mort des animaux les plus atteints. Les pertes économiques sont importantes dans de nombreuses espèces de rente, notamment parce que chaque année, des milliards d'euros sont dépensés pour contrôler ces parasites. L'utilisation massive de vermifuges a conduit à l'apparition de vers résistants aux traitements et rend actuellement le contrôle de ces parasites relativement limité. Il est donc urgent de trouver de nouvelles solutions de contrôle. Pour cela, nous développons des projets de recherche qui visent à mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de vers résistants mais également l'effet antiparasitaire de produits naturels. L'utilisation de la souris et de son hôte naturel *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, comme modèle, permettent de mener à bien ces études qui pourront ensuite être généralisées à l'ensemble des trichostrongles. Pour ce projet, nous utiliserons 20 souris par an sur une période de 5 ans, soit 100 souris au total.

Tous nos tests se focalisent en première intention sur les stades libres de ces parasites (œufs ou larves infestantes), qui sont les seuls que nous puissions étudier par des méthodes *in vitro*. La production de ce matériel biologique nécessite d'infester des souris âgées d'au minimum 5 semaines avec un maximum de 200 larves infestantes du ver parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. Le cycle de développement est achevé en 10 à 15 jours. Les œufs de parasites sont émis dans les matières fécales (libérés dans lumière du tube digestif après reproduction sexuée des vers adultes), ils sont cultivés *in vitro* pour produire les stades libres à la base de nos travaux. Cette récolte est effectuée sur plusieurs semaines afin de produire une quantité de matériel suffisant.

Remplacement : le ver parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri* est un parasite obligatoire dont le cycle de développement ne peut être réalisé *in vitro*. L'hôte animal est absolument nécessaire pour obtenir un cycle complet du parasite

Réduction : un nombre minimal de souris est utilisé à chaque multiplication puisqu'aucune analyse statistique n'est réalisée. Il s'agit simplement d'obtenir suffisamment de matériel biologique.

Raffinement : les souris sont hébergées en portoirs ventilés dans des cages contenant du sopalin pour enrichir le milieu (leur permettant de réaliser un nid). La pose de puces télémétriques permettra de suivre, de manière non invasive, l'infestation du parasite chez les souris en temps réel.

13403 L'exposition répétée à des situations stressantes et la consommation de substances toxicomanogènes conduisent respectivement à l'apparition de symptômes caractéristiques de la dépression et de l'addiction. Les troubles de la prise de décision sont fortement affectés dans de nombreuses pathologies psychiatriques comme la dépression et la dépendance aux drogues. Comprendre les changements au sein du cerveau qui sous-tendent ces troubles décisionnels permettrait d'envisager des interventions thérapeutiques ayant des retombées sociétales importantes pour les personnes souffrant de ces pathologies.

Les données cliniques suggèrent que ces troubles résultent d'un dysfonctionnement de plusieurs structures cérébrales. En particulier, certaines données suggèrent que ces altérations sont dues à une perturbation, au sein de ces structures, des neurones modulés par des messagers chimiques sécrétés par le cerveau (dopamine et glutamate). Pour agir un messenger chimique (= « clef ») doit

se fixer sur un récepteur (= « serrure »). Le stress et la cocaïne entraînent un déséquilibre de ces messagers qui se répercute sur les récepteurs de ces molécules (récepteurs à la dopamine et au glutamate). Nos travaux préliminaires ont montré qu'un stress chronique ou bien l'administration répétée de cocaïne augmentaient la formation de complexes (= « agrégation ») entre ces deux types de récepteurs. Nous possédons des outils pharmacologiques permettant de bloquer la formation de ces complexes.

Le but de ce projet sera de produire des modèles animaux mimant les symptômes de la dépression et de l'addiction à la cocaïne afin de déterminer le rôle de ces complexes dans les modifications induites par le stress et la cocaïne à (i) une échelle intégrée, en étudiant le potentiel bénéfique thérapeutique de cibler ces complexes de récepteurs afin d'améliorer les perturbations de prise de décision induits, (ii) un niveau cellulaire, en étudiant les changements d'activité des neurones causés par ces stimuli.

Pour parvenir à ces objectifs, notre projet sera découpé en quatre procédures principales. Nous combinerons des approches comportementales et électrophysiologiques, et utiliserons des outils viraux permettant de cibler de façon sélective ces complexes de récepteurs.

Procédure 1 : Impact de la cocaïne et du stress sur les processus décisionnels. Dans cette procédure comportementale, nous déterminerons l'impact de ces facteurs environnementaux dans des tâches décisionnelles.

Procédure 2 : Impact de la cocaïne et du stress sur l'activité des neurones du striatum (une structure cérébrale impliquée dans la décision). Dans cette procédure électrophysiologique, nous déterminerons l'impact de ces facteurs environnementaux sur les changements cellulaires au niveau du striatum.

Procédure 3 & 4 : Rôle des hétéromères dans les réponses décisionnelles (P3) et cellulaires (P4) dans un contexte d'exposition à un stress ou à la cocaïne. Dans ces procédures comportementales (P3) et électrophysiologiques (P4), nous déterminerons si le blocage des hétéromères permet d'empêcher les dérégulations décisionnelles et cellulaires induites par un stress ou la cocaïne.

L'ensemble du projet nécessitera un maximum de 1265 souris mâles adultes non transgéniques. Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R. Remplacement : La souris est le modèle le plus adéquat pour cette étude car la complexité des structures et circuits cérébraux dérégulés par le stress et la cocaïne chez l'homme est conservée chez la souris. Réduction : Nous utiliserons le moins d'animaux possibles grâce à des prévisions statistiques de la taille minimale nécessaire à chaque expérience. Les animaux ne seront engagés dans les expériences que si leur intérêt scientifique est confirmé par les résultats déjà obtenus. Raffinement : Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et contrôlé (enrichissement, température, nourriture, etc.) et leur bien-être sera suivi quotidiennement, notamment via la grille de score en annexe, qui définit des points-limites précoces et adaptés.

13404 L'athérosclérose et la rupture de plaque d'athérome est la cause principale des événements cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou encore l'ischémie du membre inférieur en fonction de sa localisation. Si les facteurs de risque conduisant au développement de cette pathologie sont actuellement bien connus, les mécanismes conduisant à la rupture de la plaque et aux accidents aigus qui suivent cette rupture restent mal connus. Le développement de nouvelles techniques d'imagerie permettant d'identifier ces plaques susceptibles de se rompre est un enjeu majeur de la recherche en pathologie cardiovasculaire actuellement et fait l'objet de nombreuses études.

Ce projet permettra de proposer de nouvelles cibles diagnostiques permettant de mieux caractériser l'athérosclérose et les plaques instables. Les plaques instables ont été caractérisées dans des modèles précliniques grâce à l'utilisation de l'histologie qui permet de visualiser leurs caractéristiques inflammatoires. Les cellules inflammatoires dans la paroi artérielle présentent une activité métabolique élevée. L'utilisation de molécules capables de rendre compte de cette activité inflammatoire locale en imagerie non invasive pourrait être d'une grande utilité dans la détection des plaques « actives » susceptibles de conduire à la rupture.

Dans ce projet, l'induction de l'athérosclérose se fera mise en place d'un régime riche en cholestérol avec ou sans dé-endothélisation de l'aorte. L'induction de plaques instables d'athérome se fera suite à une alimentation riche en matières grasses puis par une double dé-endothélisation de l'aorte. Ensuite, les animaux seront soumis à différentes modalités d'imagerie non invasives pour l'évaluation des plaques d'athérome (stabilité, étendue, quantification) par imagerie TEP (Tomographie d'Émission de Positons, après injection d'un radiotracteur), échographie ou IRM (Imagerie par Résonance Magnétique).

Ainsi, ce projet devrait aboutir à de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques en utilisant des molécules déjà utilisées dans d'autres applications d'une part et en proposant de nouvelles molécules d'autre part, permettant ainsi de mieux déterminer le risque de rupture de plaque chez les patients athéromateux. Si les résultats des analyses réalisées à l'issue du projet sont concluants, ils devraient permettre d'aboutir à la mise en place d'une étude clinique preuve de concept pour la détection de plaque instable par imagerie non invasive en clinique humaine.

Ce projet s'effectuera chez le lapin.

Toutes les procédures appliquées sur les animaux prévoient un suivi journalier de l'état de santé des animaux avec applications de points limites spécifiques suivants :

- aspect et comportement de l'animal: apathie, poil hirsute, perte importante de poils, agressivité importante, bruxisme permanent, réaction à la manipulation de la zone opérée, trémulation maintenue de la peau ;
- défaut d'alimentation et/ou de boisson sur une période de 24 à 48h se traduisant par un amaigrissement et une déshydratation (pli de peau persistant) ;
- perte de poids >20 % du poids normal maintenue sur 72h ;
- hypothermie persistante, décelée par un animal froid au toucher et réticent à bouger ;
- difficulté respiratoire, avec diminution ou augmentation anormales du rythme respiratoire ;
- plaie de chirurgie purulente ;
- abdomen dur et douloureux à la palpation ;
- faiblesse ou paralysie des membres postérieurs, se traduisant par des défauts de locomotion ;
- trauma auto-induit persistant i. e. lorsque l'animal va lécher, mordre, griffer ou secouer la zone de chirurgie.

Sur une période de 5 ans, il est prévu d'utiliser 540 lapins pour l'évaluation de l'athérosclérose dans ce projet.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle *in vitro* utilisant des cellules seules pouvant mimer et modéliser l'athérosclérose qui est une pathologie multifactorielle (rôles importants de l'alimentation, de l'inflammation, du stress oxydant, etc). Cependant, l'utilisation des animaux ne se fera qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.
- Réduction des animaux : le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé, le nombre d'animaux est réduit à son minimum pour chaque groupe. De plus, l'imagerie non invasive permet de réaliser différentes sessions d'imagerie sur le même animal et donc d'évaluer la progression de la pathologie.

- Raffinement : Evaluation régulière de points limites (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal), hébergement par paires d'animaux socialisés, enrichissement du milieu dans les cages

Les animaux utilisés dans le projet ne seront ni ré-utilisés, ni replacés car euthanasiés en fin de procédure. Les organes d'intérêts (vaisseaux, coeur et foie) seront conservés pour les évaluations *ex vivo*.

13405 Le microbiote intestinal est composé de 1014 bactéries, essentielles dans la santé de l'individu. Toute altération de cette communauté impacte différents organes (intestin, foie, tissu adipeux) induisant de nombreuses maladies notamment métaboliques. Nos résultats précédents démontrent

également un impact du microbiote intestinal sur la fonction et le métabolisme du muscle squelettique, caractérisée par une fatigabilité accrue et une chute des stocks musculaire en glycogène, un substrat énergétique essentiel au muscle. Ces résultats posent la question de l'implication du microbiote intestinal dans les maladies neuromusculaires de type myopathies, affectant la structure et les capacités fonctionnelles du muscle squelettique. Parmi celles-ci la myopathie de Duchenne est la plus connue car la plus répandue. Elle est associée à des facteurs de morbidités (sédentarité, fatigue musculaire, trouble digestif, fragilité respiratoire induisant le recours fréquent à des traitements antibiotiques) et à une mortalité précoce, autant de facteurs associés qui peuvent altérer la composition du microbiote intestinal. A l'inverse, nous savons que la souris génétiquement modifiée *Mstn*^{-/-} présentant une hypertrophie musculaire dispose d'un microbiote intestinal spécifique et que l'exercice physique régulier impacte également positivement la composition microbienne.

Tous ces éléments nous permettent de poser les hypothèses suivantes :

Existe-t-il une corrélation entre le microbiote intestinal spécifique et un phénotype musculaire particulier (hypertrophique ou dystrophique) ? Et est-ce que les effets bénéfiques de l'exercice peuvent être transférés à l'hôte par transfert de flore ?

Faire émerger une signature microbienne associée à un phénotype musculaire offre de manière innovante la possibilité d'utiliser le microbiote intestinal comme cible thérapeutique de la fonction musculaire.

Pour finir, dans cette étude, nous prévoyons d'utiliser 240 souris dont 156 génétiquement modifiées. Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur de la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soin et suivi, compétence et responsabilité du personnel, prise en charge de la douleur...).

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation.

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

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le report semainier des poids corporels sera un paramètre intégré à nos protocoles. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h. Les tests de course se réaliseront sans utilisation de stimulus électrique, les tests d'habituation permettront de discriminer les souris « coureuses » qui courent facilement. Les souris qui refuseront de courir sans utilisation de stimulus électrique seront exclues des groupes entraînés.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets de différentes approches thérapeutiques (génétique, nutritionnelle...) sur le dialogue inter-organes. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau du microbiote intestinal ainsi qu'au niveau des métabolites dérivés des bactéries, peuvent influencer la fonction musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers le modèle animal se rapprochant le plus de l'humain sur la physiologie musculaire et avons donc choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles. Le modèle cellulaire ne peut pas reproduire les systèmes intégrés entre les organes.

13406 La maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Lors des poussées inflammatoires, ces maladies se caractérisent le plus souvent par des douleurs abdominales, des diarrhées fréquentes, parfois sanglantes, ou encore une atteinte de la région anale (fissure, abcès). Ces symptômes font peser sur la maladie un certain tabou et rendent la vie des patients qui en souffrent particulièrement difficile. Il n'existe malheureusement pas de traitement curatif.

La recherche appliquée menée ici a pour objectif de tester de futurs candidats médicaments ou compléments alimentaires qui pourront permettre de mieux prendre en charge ces maladies et de les traiter de façon durable.

Il est donc important de pouvoir disposer de modèles expérimentaux permettant une meilleure compréhension et analyse des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de ces maladies inflammatoires ainsi que l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques visant à améliorer la santé des patients.

Lorsque cela est possible, les candidats médicaments sont évalués sur culture cellulaire ou tissu isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Cependant ce type d'approche nécessite le recours au petit animal car il n'existe pas encore de modèles cellulaires ou en tube à essai supplémentifs permettant de mimer tous les paramètres moléculaires, cellulaires et cliniques complexes de ces maladies. Un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques du domaine.

Dans ces modèles, nous utiliserons des souris et des rats. Il est prévu d'utiliser 1440 animaux.

13407 Le parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants conduits en système pâturé est une cause majeure de morbidité et de mortalité, entraînant donc des pertes de production. L'émergence de la résistance aux anthelminthiques et la préoccupation légitime des consommateurs concernant les résidus chimiques dans les produits animaux, soulignent l'importance de mettre au point des stratégies alternatives de contrôle. Une stratégie prometteuse pour le contrôle des nématodes gastro-intestinaux (NGI) est l'amélioration de la réponse de l'hôte par la sélection génétique d'animaux résistants. Il a été montré que les ovins sont plus résistants que les caprins et que certaines races sont plus résistantes aux NGI que d'autres, notamment la race d'ovin Martinik Black Belly élevé en Martinique et en Guadeloupe. En revanche peu de résultats sont disponibles en caprin. Nous avons montré que la chèvre Créole est un modèle biologique original pour l'étude de ce caractère d'adaptation. A notre connaissance, aucune étude sur la comparaison des réponses entre ovins et caprins n'a été conduite. Nous faisons l'hypothèse que le modèle caprin Créole apporterait des informations complémentaires qui aideraient à comprendre l'enchaînement des mécanismes en ovin, pour lequel aucun consensus clair sur les mécanismes sous-jacents de la réponse contre les NGI n'est encore ressorti. Les objectifs de ce projet sont de i) Caractériser la dynamique des réponses périphérique et locale de caprins Créole contre les infestations par les NGI : comparaison d'animaux résistants et sensibles et d'animaux pré-infestés et naïfs ; ii) Caractériser la dynamique des réponses périphérique et locale d'ovins Martinik Black Belly contre les infestations par les NGI : comparaison d'animaux pré-infestés et naïfs ; iii) Identifier les mécanismes de défenses spécifiques à ces deux pathosystèmes : NGI-ovin et NGI-caprin. La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce projet. Pour le Remplacement, les animaux utilisés ne sont pas des modèles biologiques. Ce sont les espèces (ovin et caprin) qui sont directement impactées par ces parasites. Pour le Raffinement, les prélèvements sanguins seront réalisés par du personnel expérimenté en moins de 30 secondes/prélèvement. Par ailleurs, l'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement. Les mesures des quantités d'aliments ingérés quotidiennement seront réalisées. Ainsi des comportements anormaux (prostration, absence ou faible ingestion) pourront permettre la détection précoce de situations de mal-être. Il s'agira d'un premier point limite. Le parasite *H. contortus* est hématophage, des mesures de l'hématocrite permettront de détecter des niveaux d'infestation trop sévère (en dessous de 15% les animaux sont traités par un anthelminthique). Et enfin, pour la Réduction, un total de 96 animaux (n=32 ovins et n=64 caprins) sera utilisé dans ce projet ; ce qui correspond à l'effectif minimum d'après les tests statistiques de puissance réalisés pour ce plan expérimental. Ce programme repose sur un

troupeau expérimental de caprin Créole en production élevé au pâturage (250 mères suitées réparties en 12 familles) et 2 troupeaux expérimentaux divergents (résistants et sensibles aux NGI, 2x35 mères suitées) sélectionnés à partir du précédent. Jusqu'à présent, ce projet s'est appuyé sur l'analyse de phénotypes synthétiques (comme l'excrétion d'œufs de parasites dans les fèces, l'anémie, l'éosinophilie sanguine...) qui nous ont permis d'avancer dans la connaissance de nos caractères et de dégager des premières pistes de mécanismes. Ces phénotypes restent la base de nos études.

13408 Les changements globaux, tels que le réchauffement climatique ou l'introduction d'espèces invasives, sont les principales menaces qui perturbent la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes à l'échelle du globe. Dans les Pyrénées, l'introduction de poissons d'élevage a lieu depuis le 19^{ème} siècle, initialement pour l'alimentation des curistes, et plus récemment pour les activités de pêche. Ces introductions pourraient avoir contraints les populations d'espèces natives, pouvant ainsi accroître leur risque d'extinction. Ce projet de 3 ans (2019-2021) se focalisera sur l'influence de deux changements globaux (réchauffement climatique et introduction de peuplements piscicoles) sur le calotriton des Pyrénées (*Calotriton asper* ; N=200 animaux : 120 adultes et 80 juvéniles estimés). L'objectif de ce projet est d'améliorer nos connaissances sur les interactions que les calotritons des Pyrénées ont avec les différents paramètres de leur environnement (variations de température et introductions de poissons) afin d'améliorer la conservation de cette espèce menacée via le développement de modèles prédictifs adéquates pour la protection de l'espèce dans un contexte de réchauffement climatique et de gestion piscicole.

Pour cela, il sera indispensable d'étudier des calotritons vivant dans les conditions naturelles actuelles, ayant donc subis les variations environnementales que nous souhaitons étudier. Les animaux, issus de milieu naturel, seront capturés manuellement, puis marqués par puces électroniques (procédure expérimentale 1) et pour lesquels une recherche de maladies relatives aux amphibiens sera effectuée (procédure expérimentale 2). Les deux dernières procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie et analgésie locale (5% Lidocaïne 2. 5%, Prilocaine 2. 5%) afin d'éviter au maximum le stress et la douleur engendrés. Les procédures expérimentales 3 à 5 permettront d'estimer la réaction de ces animaux face au changement climatique à travers une étude de tolérance thermique, visant à placer quelques heures les animaux dans des petits aquariums à différentes températures (5°C à 25°C) dans le but de déterminer quelles températures constituent un optimum de vie ou un maximum à tolérer. Enfin, les procédures expérimentales 6 et 7 permettront d'étudier la nature de l'interaction (prédation, compétition) calotritons-poissons en mettant en interaction indirecte (via les odeurs) et direct les deux espèces (N=40 truites issues d'élevage) dans des petits bassins dans des conditions de variations de température et de densité de ressources trophique. Tout au long de la captivité des animaux (3 mois au maximum), un indice de stress aigu sera mesuré par glycémie chez les calotritons, à divers moments de la captivité (procédure expérimentale 8) afin d'améliorer nos connaissances sur le bien-être animal et le stress engendré par les procédures chez ces animaux. Cette mesure de glycémie sera couplée à un suivi de masse corporelle ainsi que l'observation de comportements anormaux (voir ci-dessous). Il est probable que la durée et les conditions de captivité des calotritons adultes capturés favorisent leur reproduction. Nous nous attendons donc à avoir environ 80 juvéniles issus de reproduction en captivité. Après métamorphose, les juvéniles participeront également à certaines procédures expérimentales (3 à 5 ; les autres procédures étant jugées trop risquées) afin d'estimer si les performances induites sous contraintes thermiques pourraient être fixées génétiquement.

Afin d'éviter l'accumulation de passages en procédures sur les mêmes individus, les animaux capturés (120 adultes maximum = 20 individus x 6 populations) ne passeront pas par toutes les procédures énoncées ici (nombre maximum de procédures par individu : 7 sur 8). Nous veillerons à échantillonner les individus dans des populations à forte densité, étant négatives aux pathogènes (afin de limiter notre impact sur la population locale), et ayant déjà fait l'objet de suivi lors de projets précédents pour lesquelles nous avons d'autres données complémentaires (comme la diversité génétique).

Dans un but de raffinement, tous les animaux seront transportés dans des glacières réfrigérées (15°C, température moyenne de captivité) jusqu'au laboratoire et maintenus dans des conditions de captivité respectant leurs exigences biologiques (maintien en captivité dans des aquariums de 80x60x40 cm avec de l'eau déchlorée, cachettes, îlot terrestre, système de filtration d'eau et bulleur pour l'oxygénation, 20 individus par aquarium, température des pièces contrôlées entre 15 et 18°C). Le personnel compétent veillera à ce que deux passages par jour soient effectués afin de vérifier les conditions des animaux captifs. Pendant l'hébergement temporaire en conditions optimales, l'observation de comportements particuliers (comportement de fuite, prostration, perte de poids, refus de s'alimenter, mues successives, blessures, mutilation) seront considérés comme point limite. Au cours de chacune des procédures énoncées ici, l'observation de comportements spécifiques (régurgitation, apparition de spasmes musculaires, blessures, infection suite aux prises de sang ou glycémie, mutilation) seront également considérés comme point limite. Dans le cas de telles observations, le ou les individu(s) sera (seront) retiré(s) de la procédure et isolé(s) de la population. Une attention particulière lui (leur) sera portée par le vétérinaire référent (nourriture plus fréquente, relâché précoce en milieu naturel une fois la vérification vétérinaire réalisée). A la fin des procédures, les animaux seront maintenus dans des conditions optimales pendant 48H. Si aucun comportement anormal n'est observé entre temps, ils seront nourris avant d'être relâchés sur leur site de capture dans des conditions climatiques favorables à l'espèce (température extérieure à environ 20°C ; septembre 2019), soit après une captivité maximale de 3 mois). Les juvéniles seront quant à eux relâchés à la fin du printemps 2020 sur les sites de captures des parents, afin d'augmenter leur taux de survie hivernale. Quant aux truites, elles seront données à la fin des procédures à une fédération de pêche locale pour de futur relâché.

A l'issue des expériences, afin d'estimer l'impact des procédures sur les calotritons revenus dans leur milieu naturel, nous mettrons en place un suivi individuel par capture-marquage-recapture des individus marqués avec plusieurs passages par an sur plusieurs années (suivi de la condition corporelle des individus à chaque passage).

13409 Les Salmonelles sont des pathogènes intestinaux. C'est la deuxième cause de toxi-infections alimentaires en Europe avec pas moins de 90 000 cas par an. Les infections à Salmonelles nécessitent une hospitalisation dans 40 % des cas et peuvent même être mortelles dans 0,25 % des cas. De plus, les Salmonelles présentent une diversité d'hôtes très large (elles peuvent infecter tous les animaux à sang chaud) et sont donc facilement dispersées dans l'environnement. La lutte contre les infections à Salmonelles aussi bien chez l'Homme que chez l'animal représente un coût conséquent. Actuellement, le seul traitement disponible est la prise d'antibiotiques, ce qui favorise l'émergence de résistances et complique la prise en charge de ces infections. Une des pistes explorée pour le développement de thérapies alternatives est l'utilisation de probiotiques. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité de différents variants d'une souche probiotique contre une infection bactérienne à Salmonelles. Pour cela, nous allons infecter des souris avec une souche de Salmonella Typhimurium que nous mettrons en compétition avec plusieurs versions d'une souche probiotique.

La règle des 3R est respectée:

Remplacer : Nous avons au préalable fait de nombreuses études dans des tubes à essai et sur des cellules en culture, ce qui a permis d'élucider comment agissent les toxines produites par les bactéries étudiées, et de faire le premier examen de l'efficacité des différents variants de la souche probiotique étudiée. Cependant, le recours à l'animal est maintenant irremplaçable car aucun autre modèle ou tube à essai ne permet d'évaluer, au niveau d'un individu, les répercussions de ces bactéries et des toxines au sein de la flore intestinale, sur la santé.

Réduire : le nombre de souris utilisées est de 120. Nous utiliserons une lignée de souris consanguines ce qui permet de réduire les variabilités interindividuelles. Plusieurs paramètres seront analysés et suivis dans le temps sur chaque animal vivant (poids, score clinique comprenant notamment l'état général de l'animal, sa propreté, sa posture, sa température, le nombre de bactérie dans les fèces) et au moment du sacrifice (prélèvements de l'appareil digestif, des nœuds mésentériques, foie, rate et sang). Nous combinons donc plusieurs paramètres liés à la

physiopathologie des Salmonelles, ce qui permettra d'obtenir un maximum d'information avec un nombre restreint d'animaux.

Raffiner : Chez l'animal adulte, une perte de poids supérieure à 20 % du poids initial nous conduira à l'euthanasier. De plus, nos analyses des paramètres de la douleur nous permettent de définir un second point limite au delà duquel l'animal sera sacrifié. Chaque cage sera pourvue d'une quantité contrôlée d'étope pour que les animaux confectionnent des nids (important pour résister à la fièvre) ainsi que de batonnets de bois pour ronger. Chaque expérience, puis l'ensemble de l'étude, seront évaluées de façon rétrospective afin d'améliorer continuellement le protocole d'étude.

13410 Le projet consiste en le suivi par balises (télémétrie) de phoques sauvages dans leur milieu naturel, afin de mieux comprendre leurs stratégies d'utilisation de l'espace et des ressources marines et de répondre aux attentes des gestionnaires en charge de la gestion et la conservation de ces mammifères marins protégés et/ou de leur habitat naturel. Afin de réaliser ces suivis individuels, les phoques sont capturés dans leur milieu à l'aide de filets, pesés, et immédiatement tranquilisés chimiquement afin de réduire leur stress, garantir la sécurité des personnes intervenant sur l'opération (risques de morsure) et obtenir une immobilité de l'animal pendant les prélèvements biologiques et le collage de la balise. Le poil du phoque est ensuite séché et dégraissé avant le collage de la balise, quelques prélèvements biologiques sont effectués afin de compléter les informations obtenues par la balise grâce à des marqueurs génétiques et écologiques, puis les animaux sont immédiatement relâchés en mer. Ces opérations, durant environ 1 à 2 heure(s) entre la capture et le relâcher, sont intégralement réalisées sur le terrain (sur le littoral) et les animaux ne sont pas transportés en captivité. Les balises Argos ou GPS/GSM utilisées permettent de suivre leurs déplacements et activités en mer comme à terre pendant plusieurs mois (localisations, détails des plongées, périodes de repos à terre, etc.). Les balises tombent au plus tard 9 ou 10 mois après la pose, pendant la mue annuelle des phoques (lorsque le nouveau poil remplace l'ancien, la balise tombe avec l'ancien poil). Les deux espèces concernées sont le phoque gris (*Halichoerus grypus*) et le phoque veau marin (*Phoca vitulina*). Les phoques gris et phoques veaux marins étant des espèces protégées en France, une autorisation dérogatoire de capture a été obtenue du ministère de la Transition écologique et solidaire. Les informations fournies par les suivis télémétriques permettent de formuler des recommandations de gestion et de conservation pour cette faune sauvage protégée. La "règle des 3R" a été prise en compte de la façon suivante : le Remplacement des animaux n'est pas possible puisque l'objectif même du projet est de mieux connaître et décrire le comportement d'espèces sauvages à préserver, il est donc indispensable de suivre des animaux de ces espèces dans leur milieu naturel. La Réduction est réalisée par le choix de capture d'un maximum de 15 phoques par espèce, par colonie et par an : ces effectifs permettent de décrire la variabilité inter-individuelle, très forte chez ces prédateurs supérieurs, sans affecter une trop large proportion de la colonie (comptant généralement une ou plusieurs centaines d'individus). Enfin le Raffinement des procédures est réalisé par une diminution des sources de stress chez l'animal lors de la capture (absence de gestes brusques et de bruit excessif autour des animaux, linge sur les yeux pendant la manipulation, etc.), par la prise en compte des sources possibles de douleur (utilisation d'analgésiques), par la limitation des prélèvements (sanguins, biopsie de lard ou peau, phanères) au strict minimum pour effectuer les analyses biologiques pertinentes, et par le suivi de l'animal pendant l'intégralité de la procédure, jusqu'à son réveil et son retour spontané dans le milieu naturel. Les procédures mises en place réduisent par ailleurs les risques de blessure de l'animal comme des manipulateurs, de la capture jusqu'au relâcher. Le projet concerne au maximum 15 individus par espèce, par site (colonie) et par an, sur une durée totale de 5 ans, soit un total maximal de 450 phoques sur 5 ans (sur la base théorique de 3 colonies suivies par espèce et par an).

13411 Objectif du projet :

Le traitement symptomatique des pathologies du mouvement ou neurologiques en particulier les dystonies (mouvements anormaux localisés) et la spasticité (atteinte de la motricité) nécessitent le développement de nouveaux composés. Dans ce cadre, l'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet

de composés après injection intramusculaire dans le membre postérieur sur la contraction musculaire locale chez des rongeurs.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 1010 rats et 1010 souris. 10 rats et 10 souris permettront des actions de formation ou de maintien de compétences.

Avantages :

Ce projet scientifique permettra de tester les effets neurotoxiques / neuroprotecteurs de composés en développement. L'effet des composés sera évalué après injection intramusculaire à l'aide d'un test reconnu (Digit Abduction Score) permettant de mesurer la contraction musculaire. Cette mesure, sur une échelle de 0 à 4, s'effectue après avoir déclenché mécaniquement chez l'animal un sursaut caractéristique au cours duquel il étend ses membres postérieurs. Cette procédure, qui ne déclenche pas de stress particulier chez l'animal sera effectuée au maximum 15 fois pendant les premières 24 heures suivants l'injection puis 1 à 2 fois par jour pendant au maximum 20 jours.

Domages escomptés :

Le bien-être des animaux sera attentivement suivi durant toute la durée du projet grâce à des fiches d'observation/points limites adaptés aux espèces utilisées. Suite à l'administration intramusculaire des composés à tester, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Dans ce cas, les points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des rongeurs et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) :

Il n'existe pas de méthode *in vitro* validée scientifiquement reconnue qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale, car il s'agit de phénomènes complexes nécessitant d'être étudiés dans un organisme entier et vivant, pour répondre aux questions d'efficacité adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

-réduction : le nombre de rongeurs utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3. 1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Dès réception, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Une observation journalière des animaux sera mise en place. Dès le début de l'étude, des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse...) et ainsi de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, des protocoles d'analgésie ont également été établis afin de minimiser au maximum d'éventuelles douleurs dues aux procédures expérimentales.

13412 Cryptosporidium est un parasite protozoaire qui provoque des diarrhées chez l'homme et les animaux. Le parasite affecte principalement les individus nouveau-nés et les adultes dont le système immunitaire est compromis. La prévalence de Cryptosporidium parvum est élevée chez les ruminants nouveau-nés provoquant des pertes économiques importantes pour les éleveurs.

La cryptosporidiose reste mal contrôlée, il n'existe pas de vaccin et la chimiothérapie est très limitée. Chez les animaux d'élevage, les ruminants sont particulièrement touchés et seule une molécule possède une AMM (Halocur™) pour les veaux. Toutefois, pour présenter une efficacité, celle-ci doit être administrée préventivement tous les jours pendant 7 jours à tous les animaux. Ceci représente une contrainte élevée et un coût pour l'éleveur. Il y a aussi un risque qu'une résistance à ce produit unique apparaisse, rendant inefficace son utilisation.

De nombreux laboratoires et équipes de recherche à travers le monde sont à la recherche de molécules beaucoup plus efficaces pour faire diminuer l'incidence de cette maladie. Toutefois peu d'équipes possèdent à la fois l'expertise des tests *in vitro* et *in vivo* nécessaire pour valider leur efficacité.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de molécules pour contrôler la cryptosporidiose en collaboration avec des équipes de recherche académiques.

Les essais seront réalisés sur des modèles murins (souris adultes immunodéficientes et souriceaux) après une première validation sur un test *in vitro*. Le nombre maximum d'animaux qui sera utilisé est de 1105 pour les 5 ans.

Les expérimentations seront menées à bien selon le principe des 3R.

Raffiner : Afin de favoriser les interactions mères-petits, du sopalin et une boîte à œuf sont introduits dans chaque cage, ainsi la mère fabrique un nid pour sa progéniture. Pour les souris adultes qui seront déposées sur grille deux heures par jour de façon à récolter les fèces pour réaliser des comptages parasitaires, une plateforme est ajoutée dans la cage pour le bien être des souris.

Réduire : les essais développés sur les souris seront réalisés uniquement pour les produits ayant montré une efficacité *in vitro*. Par ailleurs, le projet est constitué d'étapes successives dont l'avancement et l'utilisation d'animaux sont conditionnés par le succès des étapes précédentes.

Remplacer : Ce projet vise à évaluer l'efficacité de nouvelles molécules anti-cryptosporidiennes lorsque celles-ci se sont déjà montrées très efficaces lors de tests *in vitro*. L'efficacité *in vivo* ainsi que l'absence de toxicité ne peuvent être évaluées qu'à l'aide de modèles rongeurs dans un premier temps.

Ce projet sur 5 ans permettra d'identifier de nouvelles molécules présentant des propriétés anti-cryptosporidiennes et ainsi d'élargir l'éventail de solutions préventives et thérapeutiques pour contrôler la cryptosporidiose. La validation de leur efficacité sur l'animal cible (Agneaux ou veaux) est envisagée dans un deuxième temps et fera l'objet d'une demande d'autorisation séparée.

13413 Le Syndrome de l'Hémiplégie alternante ou Alternating Hemiplegia of Childhood (AHC) est une maladie complexe et rare (1000 à 1500 cas dans le monde). Cette pathologie se manifeste par des épisodes transitoires d'attaques d'hémiplégies (paralysie totale) ou d'hémi-parésies (paralysie partielle) affectant chacun des hémicorps (bras + jambe d'un même côté) et touchant alternativement chacun des côtés. Ces épisodes paralytiques apparaissent généralement avant les 18 mois de l'enfant et ont des durées variables, de quelques minutes à plusieurs heures voire plusieurs jours. Le panel de symptômes associés peut être relativement différent d'un patient à l'autre : atteintes oculaires (nystagmus), problèmes respiratoires, phénomènes végétatifs, retard mental, retard moteur...

Longtemps restée orpheline, il a été montré en 2012 qu'une majeure partie des cas d'AHC était liée à des mutations du gène ATP1A3 (ATPase A+/K+ transporting subunit alpha 3). Le gène ATP1A3 code pour la sous-unité alpha d'une pompe Na+/K+ exprimée au niveau des neurones. La mutation non-sens D801N est la mutation hétérozygote la plus commune conduisant au développement des AHC.

Des travaux disponibles dans la littérature ont montré que la mutation D801N réduit l'activité enzymatique de la pompe Na+/K+ ATPase sans affecter l'expression de la protéine ATP1 α 3. Les modèles cellulaires bien que participant au principe des 3R au titre du remplacement car ils permettent de réduire l'utilisation des animaux, atteignent rapidement leurs limites car ils ne rendent pas compte des interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. Pour comprendre les mécanismes mis en jeu lors du développement des AHC liés à la mutation D801N, et pour obtenir des informations sur le rôle de cette protéine chez l'Homme, comme il n'existe pas de méthode alternative permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme, le recours à un modèle animal apparaît comme la meilleure stratégie pour étudier la forme mutée de la protéine ATP1 α 3. Les objectifs de cette étude sont de valider le modèle précédemment obtenu de souris Knock-In Atp1a3_D801N et d'obtenir des données sur l'impact de cette mutation sur le développement

embryonnaire, les taux de naissances et sexe ratio des animaux obtenus. Ces données seront capitales pour les essais de thérapies géniques envisagées sur ce modèle de souris Knock-In Atp1a3_D801N afin d'identifier un traitement potentiel pour les AHC liées à la mutation D801N du gène ATP1A3.

Dans le cadre de ce projet, et pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages, et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. La définition de points limites adaptés et nos surveillances régulières nous permettront d'identifier d'éventuelles souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, aliment spécifique et mise à mort dans les cas les plus graves).

Pour la réalisation de ce projet, nous hébergerons et générerons 40 individus dont 20 seront porteurs de la mutation, génétique d'intérêt si la transmission suit une répartition mendélienne. La règle de la réduction sera appliquée en produisant uniquement le nombre d'animaux requis pour les expériences. Afin de limiter l'utilisation de ces animaux aux phases d'expériences, nous procéderons à la cryoconservation de cette lignée par le sperme. Au-delà de la réduction du nombre d'animaux utilisés, cette procédure permettra aussi de garantir la pérennité du modèle de souris Knock-In Atp1a3_D801N.

13414 L'objectif du projet est de modifier le génome de nos animaux puis d'étudier les conséquences des ces modifications sur 2 générations. La technologie CRISPR, aussi appelée ciseaux moléculaires, permet de modifier avec grande précision le génome d'un organisme. Cette technologie sera utilisée dans le projet pour faire la démonstration de la maîtrise fonctionnelle de l'outil CRISPR chez le poulet en caractérisant *in vivo* quelques-uns des acteurs moléculaires impliqués dans différents phénotypes d'intérêt. Pour cela, le projet rassemblera des expertises complémentaires de différentes équipes de recherche en génétique moléculaire, biotechnologies de la reproduction, expérimentation et phénotypage.

Le projet se décline en plusieurs étapes: production des cellules reproductrices éditées, injection de ces cellules dans des oeufs receveurs, éclosion et élevage de ces animaux qui sont porteurs germinales de la mutation.

Notre protocole d'expérimentation répond à la règle de 3R :

-Remplacer. Vu qu'il s'agit de démontrer l'implication d'un gène dans un phénotype d'intérêt chez le poulet, l'espèce receveuse la plus adaptée est le poulet et aucun test *in vitro* ne peut remplacer les étapes *in vivo*.

-Réduire. Le nombre d'animaux est réduit au minimum informatif et est basé sur les publications récentes sur le sujet. Cependant, vu la variabilité des taux de réussite rapportée, la prévision exacte ne peut être réalisée. Nous envisageons d'utiliser maximum 200 animaux par gène, dont 40 seront utilisés pour la production de la génération suivante. Cela comprendra donc un total maximum de 1000 animaux sur 5 ans. Pour réduire le nombre d'animaux élevés en cage, les tests génétiques seront réalisés rapidement dans le mois qui suit la première récolte de la semence sur la semence des coqs pour garder uniquement les chimères pour la reproduction de la descendance.

-Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions similaires à celles des poulets d'élevage avec de l'enrichissement et le placement en cage individuelle est limité au strict nécessaire. Les animaux sont manipulés par du personnel formé et une réduction de la douleur lors des procédures expérimentales sera mise en place.

13415 Objectif du projet: Évaluer l'activité toxicologique *in vivo* de nouvelles entités chimiques, de produits biothérapeutiques ou de dispositifs médicaux destinés à être administrés/utilisés chez l'homme, après administration unique ou répétée par voie entérale, parentérale ou locale/cutano-muqueuse chez le miniporc.

Le miniporc est choisi comme espèce non-rongeur, tel que demandé par les autorités, pour sa capacité à prédire le mieux possible les effets indésirables susceptibles de se produire chez l'Homme.

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de documenter précocement le profil toxicologique *in vivo* du produit d'intérêt et de définir une dose sans effet indésirable reliée à un niveau d'exposition systémique. Ces données contribuent à définir les doses pertinentes pour les études chroniques et à estimer une marge de sécurité et les doses à utiliser dans les études cliniques chez l'homme. Ces procédures adressent la toxicité du futur médicament ou dispositif médical (organes cibles) conduites dans le respect des règles éthiques et selon les règles des Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et ne dupliquent aucune procédure déjà réalisée.

Domages escomptés: En accord avec les recommandations réglementaires internationales, il est nécessaire de documenter au préalable des études cliniques, l'évaluation de la sécurité du futur médicament/dispositif chez l'animal. La sélection de points limites appropriés et l'utilisation de produits analgésiques (si jugé nécessaire) seront prévues dans ce projet afin de s'assurer du bien-être animal.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement, reconnus par les autorités qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de toxicologie adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

- Choix de l'espèce: le miniporc est utilisé en raison des données scientifiques disponibles sur le modèle ainsi que les outils d'analyses *ex vivo* spécifiques disponibles (exemple analyses d'hémo-biochimie).

- Nombre d'animaux: Selon les méthodes d'analyses utilisées (réponses cliniques et biologiques) et compte-tenu des variations inter-individuelles anticipées, le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet et en accord avec le nombre exigé par les textes réglementaires.

Ce projet comporte 3 procédures expérimentales et le nombre prévisionnel d'animaux (incluant les animaux dédiés aux actions potentielles d'acquisition et de maintien des compétences pour l'ensemble des procédures expérimentales présentées dans ce projet) sur 5 ans sera de :

- 2770 mini-porcs (dont 10 maximum pour la formation)

- Les conditions d'hébergement, de soin et d'enrichissement ont été choisies de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne en vigueur. La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue/mise à jour.

Avant toutes expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au minimum 2 semaines et manipulés, afin de les habituer aux expérimentateurs. En cours d'expérimentation, les animaux seront observés quotidiennement (observations clinique, consommation de nourriture) et hebdomadairement (évaluation du poids corporel). Ainsi, le bien-être des animaux sera attentivement et régulièrement suivi, permettant ainsi de détecter toute souffrance, angoisse ou signes de stress pour les animaux. L'utilisation de points limites, définis avec l'aide du vétérinaire en charge du bien-être des animaux et toujours évalués ensemble en fonction de leur nature et/ou sévérité, permettra d'assurer un suivi de l'état général des animaux, de préserver leur bien-être, ainsi que la mise en place d'interventions précoces et adaptées. Une attention particulière est portée sur l'apparition de signes cliniques aigus/sévères (perte d'équilibre, perte de conscience, convulsions, anorexie) et/ou perte de poids (supérieure à 20% par rapport au poids maximum enregistré et durable sur une période de 48 heures). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

13416 On évalue à 6,3 millions le nombre de personnes atteintes par la maladie de Parkinson à travers le monde dont plus de 150 000 personnes en France et environ 8 000 nouveaux cas se déclarent chaque année.

L'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par ultrasons constitue une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des maladies neuro-dégénératives. D'une part, cette technique permet le passage dans le cerveau de médicaments qui, sans cette action, seraient restés dans le système sanguin (ce qui est le cas pour 95% des médicaments disponibles sur le marché). D'autre part, même en l'absence de toute coadministration de médicaments, cette même technique permet le passage d'anticorps endogènes, molécules normalement trop volumineuses pour cela. Cela induit une réponse auto-immune dans les zones atteintes par la maladie. L'efficacité de cette technique a déjà été prouvée sur des modèles de souris Alzheimer.

L'objectif de ce projet est de déterminer le potentiel des ultrasons focalisés transcrâniens à diminuer le niveau de neuromélanine intracellulaire (un marqueur de la maladie de Parkinson) sous les seuils pathologiques, ainsi que de stimuler l'élimination de la neuromélanine extracellulaire afin de prévenir, arrêter ou retarder les dysfonctionnements neuronaux et la dégénération liés à la maladie de Parkinson. Des tests comportementaux seront effectués afin de comparer la dégénérescence cognitive des animaux traités par rapport aux animaux contrôles.

Dans cette étude, nous utiliserons des rats, un modèle animal parfaitement adapté, dont le nombre sera réduit au maximum (60 au total) grâce à l'analyse statistique préalable sur la taille des groupes requise pour réaliser l'étude, dans le but d'obtenir des résultats significatifs. L'utilisation des animaux est indispensable pour valider notre étude: ni l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, ni la maladie de Parkinson ne peuvent être modélisés autrement à l'heure actuelle.

L'ouverture transcrânienne de la barrière hémato-encéphalique constitue en elle-même une procédure de raffinement permettant l'action de molécules sur le cerveau qui, sans cette technique, seraient injectées de façon invasive et après craniotomie.

Le bien-être des animaux sera assuré tout au long de leur manipulation, depuis les conditions d'hébergement jusqu'à la minimisation de la douleur lors des procédures expérimentales. La procédure sera stoppée en cas de stress ou de douleur non contrôlé. A leur arrivée les animaux auront une semaine d'acclimatation pour s'adapter à leur nouvel environnement. Une surveillance quotidienne des paramètres environnementaux tels que la lumière, la température et l'hygrométrie, le pH de l'eau, etc, est réalisée au sein de l'animalerie.

13417 En France, l'élevage des oies et des canards est principalement destiné à la production de foie gras. Le système de production du foie gras est basé sur la capacité spontanée des palmipèdes à l'hyperphagie, à la synthèse et au stockage des graisses dans le foie ; phénomène probablement lié au comportement migratoire de leurs congénères sauvages qui ont la capacité naturelle de surconsommer des aliments pour stocker l'énergie avant de longues migrations. Les producteurs (éleveurs) ont développé des programmes d'alimentation spécifiques pour utiliser ce phénomène naturel. Dans la pratique, le programme d'alimentation des palmipèdes en croissance a pour objectif de préparer les oiseaux au gavage en assouplissant l'œsophage et en améliorant la capacité d'extension de ce dernier. Mais actuellement, l'appréciation du niveau de préparation des animaux au gavage ne peut se faire que par l'intermédiaire d'enregistrements de niveaux moyens de consommation alimentaire par lot d'animaux durant la phase de pré-gavage ou par contrôle après dissection sur quelques individus. Nous proposons une mesure *in vivo* individuelle du volume de l'œsophage qui ne nécessite pas la mise à mort des animaux. Tout en se basant sur le principe du gavage, cette méthode consiste à mesurer le volume de l'œsophage en introduisant via un embuc de gavage un ballonnet (préservatif) dans l'œsophage. Ce ballonnet est ensuite gonflé à pression constante (70mm de mercure ; pression mesurée à l'aide d'un tensiomètre médical) et le volume d'air introduit est mesuré par déplacement d'une colonne d'eau qui ré-aspire l'air injecté dans le ballonnet. Cette méthode nécessite statistiquement 48 animaux par modalité testée. On considère que cette procédure effectuée au maximum sur un essai par an, pendant deux ans, avec un maximum de trois modalités par essai ; soient 288 animaux au maximum. A la suite de cette mesure, les animaux poursuivront l'essai zootechnique nutritionnel et suivront des pratiques d'élevage classiques. Aucun gavage n'aura lieu sur ces animaux.

Remplacer : cette mesure est, pour le moment, irremplaçable puisque la mesure du volume de jabot est systématiquement faussée et ne peut être standardisée post-mortem du fait de l'élasticité du

jabot qui se déforme après la mort de l'animal. Cette mesure pourra en revanche permettre le développement d'un modèle de prédiction du volume de jabot par rapport aux éléments de formulation et au poids vif des animaux, dans les années à venir.

Réduire : au total, 128 animaux sont élevés dans cet essai. Pour limiter le nombre d'animaux à manipuler Toutefois, seuls 48 animaux seront concernés par cette mesure (1 parquet de 16 animaux par groupe). Ce nombre est optimal pour observer des différences significatives sur le volume de jabot

Raffiner : ce dispositif de mesure de volume de jabot a fait déjà l'objet d'une saisine qui a reçu un avis favorable. La mesure sera effectuée par la personne qui l'a mise au point et la maîtrise depuis plusieurs années. Aucun signe de souffrance n'est observé chez les animaux manipulés pendant ou après la mesure. Les animaux sont élevés en parquet avec une densité de 2 animaux /m², densité plus faible que celle dans les élevages terrain afin d'éviter toute réaction de nervosisme et de stress chez les animaux.

13418 Le système nerveux autonome, composé du système sympathique et parasympathique, est la partie du système nerveux gérant de façon involontaire le fonctionnement des organes et l'homéostasie interne. Il a été montré dans des études antérieures que le système nerveux autonome était impliqué dans la régulation de la glycémie cependant son action reste encore mal défini.

L'objectif de notre projet est d'explorer la neurophysiologie du métabolisme glucidique au niveau hépatique. Ceci dans le but d'apporter de nouvelles solutions thérapeutiques complémentaires à la prise en charge du diabète de type 2, qui se caractérise par une hyperglycémie chronique. Cette étude permettra également d'apporter des explications sur la part neurophysiologique de l'amélioration du profil glucidique à la suite d'une chirurgie métabolique.

Pour effectuer cette étude, nous avons choisi le modèle porcin car il présente de nombreuses similarités avec l'homme, que ce soit sur le plan anatomique, métabolique et physiologique. Cette proximité morphologique permet notamment de reproduire les mêmes techniques chirurgicales. De plus, le modèle porcin a déjà été utilisé au sein de notre laboratoire lors d'études antérieures, ce qui nous permettra de comparer nos résultats et de réutiliser certaines techniques chirurgicales spécifiquement développées pour la recherche chez le mini-porc.

Nous pratiquerons donc chez le porc soit une dénervation sympathique par dénervation de l'artère hépatique ou section du nerf splanchnique, soit parasympathique en résequant les nerfs au niveau de la veine portente ou en sectionnant le nerf vague. Afin de permettre l'évaluation du métabolisme glucidique un cathéter au niveau de la veine porte et un cathéter jugulaire sera mis en place.

Nous réaliserons des dosages sanguins des différents paramètres métaboliques lors de repas test chez des animaux vigiles. Des biopsies (foie, tissus adipeux viscéral et sous cutané, pancréas, muscle) seront effectuées lors de la dénervation et lors du sacrifice de l'animal. Ces derniers permettront de réaliser des western blot (technique de biologie moléculaire qui permet la détection spécifique de protéine d'intérêt sur une membrane cellulaire) et de l'immunohistochimie (méthode de localisation des protéines situées dans les cellules d'un tissu par immunomarquage)

Les animaux utilisés dans cette étude seront hébergés individuellement. Afin de limiter leur nombre, nous serons particulièrement attentifs à leur développement et à leur rétablissement en utilisant des traitements anti-douleurs avant, pendant et après toute chirurgie. De plus, le statut de grand mammifère implique l'utilisation d'un minimum d'animaux ("Réduire") et nous optimiserons leur nombre ("Raffiner") en réalisant un maximum de tests et de prélèvements tissulaires par individu. Cependant nous ne pouvons pas "remplacer" l'utilisation d'animaux car nous étudions des mécanismes physiologiques. Pour réaliser cette étude, nous estimons donc le nombre d'animaux nécessaire à 24 par an soit 120 individus sur 5 ans.

13419 L'hypertrophie ou l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est l'affection la plus fréquente de l'homme âgé, touchant 70% des hommes de plus de 60 ans et 90% des plus de 70 ans. Les manifestations cliniques sont très variables d'un individu à l'autre allant de l'absence totale de signes

cliniques, malgré un volume prostatique élevé, à une dégradation significative de la qualité de vie dues à des problèmes mictionnels liés à une obstruction vésicale tels que pollakiuries (augmentation de la fréquence mictionnelle pendant la journée), dysuries (difficulté à émettre les urines).

L'HBP est une entité histologique caractérisée par une hyperplasie des cellules du stroma et de l'épithélium prostatique. Cependant, les mécanismes physiopathologiques de l'HBP restent encore mal connus. Aujourd'hui encore les traitements sont empiriques, avec pour but de soulager et diminuer l'intensité des symptômes et leur impact sur la qualité de vie des patients plutôt que d'agir sur la cause.

Un modèle expérimental chez le rat a été décrit dans la littérature pour étudier et caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'une hypertrophie de la prostate. Ce modèle expérimental consiste à traiter des rats mâles avec du sulpiride pendant 30 jours consécutifs (injection intrapéritonéale). Ce traitement chronique induit une augmentation du poids des lobes latéraux de la prostate ainsi qu'une inflammation, proche de ce qui est observé chez les patients atteints d'HBP.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques sur l'hypertrophie et/ou l'inflammation de la prostate induite pharmacologiquement par l'administration de sulpiride ainsi que leurs potentiels effets sur la fonction vésicale. Actuellement, les méthodes alternatives permettant d'évaluer ces effets n'existent pas. Ainsi, le recours à l'expérimentation animale reste incontournable.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement adapté sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de les stimuler (tel que des aspens bricks (morceaux de bois) ou des tunnels en polycarbonate). Un suivi journalier des animaux sera effectué par les zootechniciens afin de déceler l'apparition de points critiques tels qu'un comportement atypique (vocalisation, prostration, agressivité vis-à-vis de ces congénères), la présence d'une déshydratation et/ou perte d'appétit. L'apparition d'un ou de plusieurs de ces points critiques entraînera la mise en cage individuelle de l'animal afin de lui apporter les soins nécessaires et de le suivre pendant au moins 48h. En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante. Le nombre d'animaux utilisés sera de 1080 mâles à raison de 12 animaux par lot (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs).

L'efficacité des molécules pourra être évaluée selon 3 approches différentes (analyse mictionnelle, hyperplasie et inflammation de la prostate) et ce, sur le même animal. De plus, l'analyse du profil mictionnel par l'utilisation de cage à métabolisme est une méthode non-invasive qui permettra donc de suivre au cours du temps, sur un même animal, l'effet des molécules testées. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

13420 L'ischémie reperfusion (IR) rénale se caractérise par une interruption du flux sanguin au niveau rénal puis une reperfusion. Ce phénomène peut se présenter en clinique lors d'un infarctus du myocarde, d'une insuffisance rénale, d'une occlusion ou d'une obstruction des vaisseaux rénaux, d'un choc septique ou pendant une chirurgie vasculaire. De récentes études épidémiologiques ont démontré que l'IR représente une cause importante d'insuffisance rénale, condition clinique associée à une haute mortalité chez l'homme. A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie efficace pour prévenir ou traiter la perte de fonction et les dommages rénaux post-ischémiques, mise à part la thérapie de remplacement d'organe (dialyse ou transplantation). Pour cette raison, l'efficacité des traitements préventifs et des traitements de suppléance restent un enjeu majeur pour la recherche pharmacologique.

Plusieurs modèles peuvent mimer la pathologie. Le modèle d'ischémie reperfusion unilatérale précédée d'une néphrectomie chez le rat est celui utilisé pour mimer les dommages les plus sévères lors d'une ischémie car la néphrectomie exacerbe ces dommages mais aussi permet de mimer les cas d'uni-néphrectomie ou de patient transplantés. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de

molécules de référence et/ou candidat médicaments sur la perte de fonction et sur les dommages rénaux sévères post-ischémiques en clinique. Actuellement, les méthodes alternatives permettant une telle évaluation sont inexistantes. De ce fait, ce déficit rend incontournable le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments sur la perte de fonction et sur les dommages sévères rénaux post-ischémiques en clinique.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 900 rats à raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Le nombre de groupes sera fonction du nombre de candidats médicaments et/ou de doses à tester.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement de l'hébergement (type play tunnel en polycarbonate, aspen brick) sera introduit auprès de ces derniers. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours par un personnel compétent. En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermostatée. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

13421 Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleurs pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par une instabilité chromosomique.

Nous avons identifié une mutation du gène Hsp110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110. Nos résultats démontrent que cette mutation est fréquente dans les cancers MSI du colon, de l'estomac et de l'endomètre. Par des approches *in vitro*, nous avons démontré que cette mutation sensibilise les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine. Notre objectif est d'étudier le rôle de la mutation d'Hsp110 dans la tumorigenèse MSI. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique pour Hsp110 qui reproduit la mutation humaine.

Notre hypothèse est que la mutation d'Hsp110 pourrait induire une amélioration de la réponse à la chimiothérapie et modifier le tableau clinique (ralentissement du phénotype tumoral, augmentation de la survie). Les souris MSH2 KO Hsp110 seront donc comparées aux souris MSH2 KO pour vérifier notre hypothèse.

Dans ce projet, les traitements par chimiothérapie interviendront après 150 jours de vie correspondant à un traitement de type « curatif » (souris non symptomatique mais qui ont déjà commencé à développer la pathologie attendu).

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation de 120 souris transgéniques pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement tumoral qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

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

13422 Le nombre de patients atteints de néphropathies chroniques et par conséquent en insuffisance rénale, est en constante augmentation au niveau mondial. La pathologie rénale chronique plus connue comme « chronic kidney disease » (CKD) est la résultante de dommages progressifs des glomérules, des tubules, de l'interstitium et des vaisseaux. Ces caractéristiques peuvent être causées, aggravées ou ralenties par différents facteurs comme l'hypertension, l'alimentation, les médicaments, la génétique ou des infections.

Une néphrectomie 5/6èmes consiste en une réduction du nombre de néphrons fonctionnels de 5/6èmes de la masse totale rénale. Cette chirurgie est réalisée sous anesthésie en deux temps et les animaux sont observés pendant environ 12 semaines après la chirurgie. En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermostatée. Ce modèle mime la perte de fonction rénale qui est la conséquence d'une perte de la masse rénale chez l'homme soit par un acte chirurgical soit par un dysfonctionnement d'une grande partie du tissu suite à une détérioration progressive de celui-ci. Le modèle de néphrectomie 5/6èmes présente les caractéristiques suivantes : augmentation des protéines urinaires, de l'urémie, de la créatinine sérique et une diminution du débit de filtration glomérulaire indiquant une perte de fonction de l'organe. Au niveau histologique une hypertrophie et une hyperplasie des glomérules est mise en évidence. Sur le long terme une glomérulosclérose et finalement la fibrose s'installent. Ces caractéristiques sont les mêmes qui sont retrouvées dans les cas cliniques de CKD. Une hypertension peut être également associée à l'évolution de la pathologie et est un facteur accélérateur de l'installation de la pathologie. Le développement de ce modèle de 5/6èmes peut donc nécessiter, en fonction des cibles de nos potentiels clients, le développement ou pas de cette hypertension.

Actuellement, les méthodes alternatives permettant une telle évaluation sont inexistantes. De ce fait, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement des atteintes glomérulaires.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement de l'hébergement (type play tunnel en polycarbonate, aspen brick pour les rats et carré coton pour nidation, aspen brick pour les souris) sera introduit auprès de ces derniers afin de les stimuler.

Des groupes de 10 à 20 animaux seront réalisés de manière à obtenir des résultats suffisants, reproductibles et fiables tout au long de l'expérimentation. Le nombre de groupes sera dépendant du nombre de molécules et de doses à tester. On prévoit d'utiliser 900 rats et 900 souris pour ce projet. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé quotidiennement afin de déceler l'apparition de points limites tels que le développement d'un comportement anormal (vocalisation, agressivité, automutilation...), présence d'un poil hérissé et/ou non brillant, état de prostration et non réactivité de l'animal, perte de poids inférieur à 20 %. Si un ou plusieurs de ces critères sont observés, et que les actions correctrices prises (par exemple : animal isolé ou mise à disposition de croquettes directement dans la cage) ne permettent pas une amélioration des points limites, l'animal sera retiré de l'étude et mis à mort.

En cours d'expérimentation des prélèvements de sang et des récoltes d'urines pourront être réalisés ainsi que des mesures de pression artérielle. A la fin des expérimentations les animaux seront mis à mort afin de prélever les tissus d'intérêt pour les analyser.

Ce projet incluant des procédures classées sévères subira une évaluation rétrospective par les autorités compétentes.

13423 Les maladies allergiques d'origines cutanées (p. ex., la dermatite atopique), respiratoires (p. ex., l'asthme allergique) ou alimentaires sont en plein essor dans les pays développés. Il est maintenant estimé qu'un tiers des français souffrent d'une ou plusieurs formes de maladies allergiques, dont certaines peuvent s'avérer fatales (p. ex., certaines formes d'asthmes réfractaires aux corticoïdes ou encore des chocs anaphylactiques induits par l'ingestion de cacahuètes). L'origine des diverses maladies allergiques chez l'homme est extrêmement complexe et plusieurs facteurs (p. ex., immunologique, génétique, environnemental, neuronal etc...) sont suspectés d'être impliqués dans leur développement. Ce programme de recherche a pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'allergie et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Devant la complexité de ces maladies, due notamment à l'implication de différents organes et types cellulaires, le recours aux modèles animaux est indispensable. L'espèce utilisée pour ce projet de recherche est la souris de laboratoire. Nous estimons devoir utiliser 1980 souris sur les 5 années que durera ce projet. Ce nombre inclut le nombre minimum nécessaire de contrôles et la nécessité de reproduire les résultats, en respect avec la règle des 3R. Le calcul du nombre minimal d'animaux par groupe a été fait sur la base de notre expérience antérieure avec les modèles d'allergie que nous allons utiliser et des tests statistiques que nous avons effectués lors de ces études antérieures. Les animaux seront observés quotidiennement, bien que nous n'anticipons pas d'apparition de signes de douleur dans nos modèles d'allergie. Tout animal présentant une douleur évidente (isolement, baisse importante de l'activité, perte de poids > 20%, pilo-érection et/ou grimace) sera immédiatement mis à mort. Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser (utilisant 1800 animaux pour la totalité des projets) contribueront à mieux comprendre le développement des maladies allergiques et à identifier de nouvelles stratégies pour prévenir et soigner ces maladies.

13424 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous. Or, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE), il est obligatoire de prouver l'efficacité de ces produits avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de tester intégralement l'efficacité des produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de produits hémostatiques afin de sélectionner les meilleurs candidats pour les tests précliniques *in vivo* de confirmation d'efficacité. La cascade de la coagulation a deux voies : la voie d'activation de contact (anciennement connu sous le nom de voie intrinsèque), et la voie du facteur tissulaire (anciennement connu sous le nom de la voie extrinsèque). Bien qu'il soit connu que la principale voie pour l'initiation de la coagulation sanguine soit la voie du facteur tissulaire, la coagulation associée aux dispositifs et biomatériaux en contact avec le sang intervient principalement par la voie d'activation de contact. Un des facteurs permettant de mesurer l'activité de coagulation sanguine d'un dispositif médical est le temps de coagulation. La détermination du temps de coagulation consiste à mesurer le temps nécessaire pour que du sang total non anti-coagulé coagule après sa mise en contact avec un dispositif médical.

Le volume de sang total pouvant être prélevé chez un même donneur humain à un temps T étant limité, le modèle ovin est couramment utilisé pour ce test puisqu'il permet le prélèvement d'une

quantité de sang par animal suffisante et que le profil de coagulation du mouton est proche de celui de l'humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les contraintes scientifiques (nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des tests). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal issu d'une procédure de gravité légère ou modérée après une période de repos). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 100 ovins.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur hors période de prélèvement.

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

13425 Projet : Nos données préalables chez la souris montrent que la sur-/sous-nutrition durant la lactation est suffisante pour programmer la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). Ceci programme la croissance postnatale de l'organisme mais influe également sur l'émergence des pathologies adultes. En effet, la dérégulation de la GH semble être un facteur aggravant dans l'émergence des pathologies cardio-métaboliques (résistance à l'insuline, obésité, hypertension artérielle). Nos données indiquent que cette programmation est réalisée au niveau de l'hypothalamus par les hormones nutritionnelles telles que l'IGF-I et la Leptine qui provient du tissu adipeux.

Le facteur de différenciation Preadypocyte factor 1 (ou Pref1) est un facteur crucial pour formation des adipocytes et la capacité du tissu adipeux à sécréter de la leptine. La restriction nutritionnelle durant la lactation, qui est associée à un défaut de développement du tissu adipeux, pourrait agir en partie via Pref1. De manière intéressante, l'expression du facteur Pref1 a été observé dans l'hypothalamus et l'hypophyse de souris. Un rôle dans le développement de certaines sous-populations hypophysaires a été suggéré, potentiellement via la voie Notch. Nous supposons que Pref1 pourrait être un médiateur de la restriction nutritionnelle sur le développement des neurones GHRH et des cellules hypophysaires GH.

Le projet soumis est conçu pour déterminer chez la souris si la concentration circulante en Pref1 est régulée par la nutrition au niveau sanguin par ELISA et localement, au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Ces mesures locales seront réalisées *in vitro* par RT-qPCR et western-blot sur les tissus récoltés de manière appropriés. Puis, nous souhaitons connaître quels sont les types cellulaires dans ces deux tissus qui l'expriment. Ceci sera déterminé par immunohistochimie et hybridation *in situ* sur les tissus récoltés de manière appropriés.

Type d'animaux : souris *mus musculus*

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 386 souris expérimentales pour une durée maximale de 5ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet impliquant de nombreux aspects métaboliques. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

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

13426 Projet : Chez l'homme, les retards de croissance, qu'ils apparaissent chez le fœtus ou juste après la naissance, sont associés avec une plus grande fréquence de maladies cardio-métaboliques. Notamment, des perturbations de la balance énergétique entraînant des variations de poids corporel à l'âge adulte, et une résistance à l'insuline sont fréquemment observées.

Nos données préalables montrent que la sur-nutrition en période post-natale précoce chez des souris mâles nés avec un retard de croissance intra-utérin (RCIU) entraîne une résistance à l'insuline dès 3 mois. A l'inverse, une restriction alimentaire à la suite d'un RCIU préserve de l'insulino-résistance. Ainsi, une altération des conditions nutritionnelles en période périnatale entraîne une dérégulation de l'homéostasie glucidique chez les souris mâles nés avec un RCIU. En revanche, les souris femelles nées avec un RCIU semblent protégées puisque leur tolérance au glucose et leur sensibilité à l'insuline ne sont pas modifiées même à un âge avancé (12 mois). Cependant, leur capacité d'adaptation métabolique face à une situation de demande métabolique accrue reste à définir. La gestation pourrait constituer ce challenge métabolique. En effet, une insulino-résistance se met en place chez la mère afin de favoriser un flux massif de glucose vers le fœtus.

L'objectif du présent projet est de caractériser l'impact d'une sur- ou sous-nutrition en période post-natale précoce sur l'adaptation métabolique à la gestation chez des souris nées avec un RCIU. Nous étudierons deux situations : l'adaptation au cours de la première gestation (primipare) et, afin de déterminer les effets combinés du nombre de gestations avec l'âge, l'adaptation suite à de multiples gestations (multipares). Etant donné les mécanismes en jeu, impliquant une physiopathologie complexe, et les dérégulations sur le long terme, l'approche *in vivo* est obligatoire. Type d'animaux : Etant donné le rôle du placenta dans les mécanismes physiopathologiques étudiés, nous avons choisi le modèle murin (mammifère placentaire), qui est petit et de bonne productivité, ce qui réduit le nombre de femelles génitrice nécessaire.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1476 souris pour une durée maximale de 5 ans répartis comme suit : 356 fondateurs et 1120 animaux de première génération. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet impliquant de nombreux aspects métaboliques. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu et notamment au cours de la gestation.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Le nombre minimal de souris utilisées lors de ce protocole est calculé afin d'obtenir la puissance statistique nécessaire à la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques recherchés. Le nombre de souris, ainsi que les timings de traitement et des mesures diverses ont pu être calculés grâce à la profonde connaissance de ce modèle murin au sein du laboratoire, ainsi que des mécanismes en jeu. Ainsi,

nous étudierons une dose unique de restriction protéique afin d'induire le RCIU et nous mesurons les effets à des âges clefs mis en évidence lors de nos précédentes études.

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

13427 Généralités : Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et complexe. Une part importante du développement repose sur l'analyse des relations existantes entre les doses administrées et les effets thérapeutiques et/ou indésirables. L'étude de l'action de l'organisme sur une molécule au cours du temps (ou pharmacocinétique (PK)) est une étape primordiale à la détermination la plus précise possible du régime posologique qui garantira un rapport efficacité/tolérance optimal.

Objectif du projet : Evaluer les principaux paramètres PK d'une molécule au niveau sanguin et tissulaire après administration unique et/ou répétée par voie systémique (orale, veineuse ou intra péritonéale...) et/ou topique d'une molécule chez le rat ou la souris.

Avantages : La procédure expérimentale mise en œuvre permet d'évaluer les principales propriétés pharmacocinétiques (PK) de molécules. Les données ainsi obtenues contribueront au profilage et à la sélection de molécules candidates à utiliser chez l'homme pour le traitement de pathologies.

Domages escomptés :

Dans ce projet, 2 types de dommages éventuels ont été recensés et anticipés

1. Un stress lié à l'hébergement individuel, nécessaire afin de ne pas nuire aux objectifs de l'étude
2. L'inconfort engendré par le port d'une protection (gilet ou bandage). Celle-ci étant indispensable afin que les animaux n'ingèrent pas le produit lorsque celui-ci est appliqué sur la peau.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative fiable à l'expérimentation animale pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques de molécules.

Nombre et type d'animaux: conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement)

- Choix des espèces : L'espèce rat est choisie pour satisfaire aux exigences réglementaires pour la détermination du profil pharmacocinétique des molécules dans une espèce rongeur et également en raison de l'adaptabilité de l'espèce pour ce type d'étude (possibilité de prélèvements sanguins répétés sur le même animal).

L'espèce souris est généralement utilisée pour mettre en place les modèles de pharmacodynamie (PD) en raison de l'abondance de littérature scientifique et de l'existence d'outils d'analyse spécifiques. Aussi, l'espèce souris est choisie pour évaluer les propriétés PK des molécules dans la souche utilisée pour la PD afin d'établir la relation PK/PD nécessaire à une bonne compréhension du mode d'action de la molécule.

- Nombre d'animaux : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est ajusté en fonction des objectifs de l'étude, des méthodes d'analyse et est réduit à son minimum par une approche statistique adaptée sans compromettre les objectifs de l'étude.

Compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, au minimum 3 animaux par point de mesure pourraient être utilisés pour permettre une analyse robuste des résultats générés.

Sur une période de 5 ans, 65400 animaux seront nécessaires : 37800 souris et 27500 rats si l'ensemble des procédures est réalisé, et 50 souris et 50 rats pour la formation et le maintien des compétences des gestes techniques

Méthode de réduction : Dès lors que les méthodes bio-analytiques le permettront, des micro-prélèvements de sang seront effectués sur les animaux (volume <20µl chez la souris et <50µl chez le rat). Cette méthode permettra ainsi d'effectuer plusieurs prélèvements sur un seul et même animal et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaire à chaque étude d'un facteur 8 à 10.

- Méthode de raffinement : Conditions d'hébergement et de soins :

Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux

Rats et souris doivent généralement être hébergés en cages collectives. Cependant selon la souche, le sexe et le protocole d'étude, les animaux pourront être amenés à être hébergés en cages individuelles à la fois pour éviter d'éventuels conflits entre congénères et les contaminations croisées lorsque le produit est appliqué directement sur la peau.

De plus, pour l'étude de l'élimination d'un composé, les animaux pourront également être hébergés sur grille afin que les animaux n'ingèrent pas leurs fèces, ce qui compromettrait les données pharmacocinétiques.

Ce type d'hébergement peut entraîner un certain niveau d'inconfort qui sera maîtrisé par un suivi plus régulier et une durée d'hébergement ne dépassant pas 96h.

En cas de blessure ou de détresse d'un animal, les conseils du vétérinaire en charge du bien-être animal seront appliqués, comme, par exemple, le recours à un produit analgésique. Des points limites et la conduite à tenir, en cas échéant, ont été établis afin de respecter le bien-être animal.

La stratégie d'enrichissement est adaptée aux besoins spécifiques des animaux et ajustée en fonction des objectifs de l'étude.

13428 La capacité à obtenir des données fiables sur les animaux expérimentaux est fortement augmentée quand l'accès à un suivi dans le temps des individus est possible. Pour les animaux élevés en groupe, le suivi dans le temps nécessite une méthode de marquage fiable.

Dans le cas du bar, le marquage des animaux à partir de puces RFID est largement utilisé mais n'est réellement praticable qu'à partir de 300-500 mg de poids moyen. Or, un bar de 300 mg a déjà multiplié son poids par 300, en comparaison de son poids à l'éclosion qui est de 1 mg environ. Pendant cette première période de vie, le suivi individuel est impossible, alors même que des événements très importants pour la vie ultérieure de l'animal de déroulent, et en particulier le déterminisme du sexe, qui chez cette espèce combine des influences génétiques et environnementales.

Afin de mieux comprendre les phases initiales de la vie du bar, et en particulier le déterminisme du sexe, nous souhaitons tester, le plus précocément possible, la possibilité de marquer les animaux avec une nouvelle marque RFID de très petite taille (0.5 x 0.5 mm, P-Chip) déjà utilisée sur le marquage d'insectes (fourmis, abeilles) ou de petits poissons (zebrafish).

Pour ce faire, nous allons tenter de marquer des animaux à 30, 44, 58, 72 et 86 jours post fécondation, à une taille moyenne estimée de 10, 15, 20, 25 et 30 mm. A chaque date, 50 poissons seront marqués (n=250 marqués au total), et la mortalité ainsi que la croissance post-marquage seront comparées à un lot non marqué (n=250 non marqués au total, soit 500 animaux utilisés en tout), à des pas de temps de 2 semaines. Ceci permettra de définir la taille minimale à laquelle les poissons peuvent être marqués par ce dispositif sans effet adverse. La lecture des marques sera poursuivie au cours du développement afin de déterminer la taille maximale des animaux permettant la lecture de ces marques, et donc la taille à laquelle une autre méthode de marquage doit être combinée à la P-Chip.

Les animaux seront suivis sur 1 an, jusqu'à l'âge où leur sexe peut être identifié sans erreur (euthanasie puis examen des gonades).

Ce type d'expérimentation ne peut par nature être réalisé que sur des animaux vivants, donc le Remplacement n'est pas possible. Compte tenu des mortalités normales dans des élevages de juvéniles de bar (jusqu'à 50% entre 30 et 90 jours), le nombre d'animaux marqués à chaque date a

été réduit au minimum pour assurer 25 animaux marqués et 25 animaux non marqués par date de prélèvement, permettant de détecter des différences de survie de l'ordre de 15% (Réduction). Par ailleurs, les animaux seront élevés en groupes à faible densité, et systématiquement anesthésiés pour le marquage et les mesures de croissance (Raffinement).

13429 La thérapie génique, stratégie innovante consistant à apporter un gène thérapeutique dans des tissus ou cellules malades, vise à traiter des affections que l'on pensait incurables (maladies génétiques, infections virales, cancers ou maladies cardiovasculaires). L'utilisation de vecteurs recombinants dérivés des virus Adéno-associés (AAVr) constitue un outil de choix en thérapie génique mais l'efficacité de ces vecteurs est remise en cause. En effet, dans des modèles de grands animaux et chez l'homme, l'injection en intramusculaire (IM) d'un vecteur AAVr est suivie d'une perte de l'expression de son transgène, corrélée avec une réponse immunitaire dirigée contre le vecteur et/ou les produits de son transgène. Néanmoins, une étude menée au sein de notre laboratoire montre chez le primate non-humain (NHP) injecté en IM avec un AAVr, la réexpression possible du transgène malgré une perte transitoire de son expression. De récentes analyses indiqueraient la présence d'infiltrats de cellules de l'immunité potentiellement immunomodulatrices dans les muscles injectés et le foie.

Dans ce contexte, nous souhaitons étudier les rôles et les fonctions des cellules infiltrées dans les tissus injectés à l'aide d'un AAVr, afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans la réexpression du transgène observée dans notre modèle.

L'utilisation du modèle NHP est primordiale pour l'étude et la compréhension des mécanismes immunologiques et des interactions vecteur/hôte. Les modèles *in vitro* ne permettraient pas d'étudier la complexité de ces interactions et les modèles murins ne prédisent pas totalement l'immunité liée à l'AAV. Le primate est un modèle pertinent car son système immunitaire est très proche de celui de l'homme, élément important pour la translation en clinique. La présence d'infiltrats dans les tissus injectés est aussi observée en clinique chez l'homme.

Le projet prévoit d'inclure 11 primates (macaques fascicularis), répartis en quatre cohortes caractérisées par des paramètres d'injection différents :

Cohorte 1 : 3 primates recevront en IM un vecteur ssAAV2/1 porteur du transgène rtTA EPO à la dose de $1,10E+11$ vg/kg

Cohorte 2 : 3 primates recevront en IM un vecteur scAAV2/8 porteur du transgène GFP à la dose de $1,10E+13$ vg/kg

Cohorte 3 : 3 primates recevront une injection intraveineuse locorégionale de vecteur scAAV2/8 porteur du transgène GFP à la dose de $1,10E+13$ vg/kg

Cohorte 4 : 2 primates recevront une injection intraveineuse locorégionale d'un vecteur adénovirus porteur du transgène GFP à une dose qui ne dépassera pas $2 \cdot 10E12$ vg/kg afin de constituer le groupe contrôle positif.

Les animaux seront suivis durant 165 jours post-injection (pi) pour les cohortes 1, 2 et 3 et 4, avant sacrifice pour prélèvements post mortem. Des biopsies musculaires et hépatiques seront réalisées à J30 pi pour les cohortes 1, 2 et 3 et à J15 et J60 pi pour la cohorte 4. Au cours de cette étude, des prélèvements sanguins seront également réalisés sous anesthésie en pré-injection puis à différents temps post-injection afin d'assurer un suivi des paramètres hématologiques et biochimiques d'intérêt, de réaliser une quantification des différents vecteurs (qPCR) et de la protéine sécrétée par le transgène rapporteur dans le sang.

Amendement : suite à l'injection des deux premiers animaux de la cohorte 1 et à l'obtention de données préliminaires montrant deux profils différents et inattendus, nous souhaitons injecter 2 autres primates pour cette même cohorte afin d'affiner nos données et renforcer nos analyses. Un remaniement des cohortes est donc indispensable car nous ne souhaitons pas augmenter le nombre d'individus à inclure dans cette étude :

Nouveaux groupes expérimentaux :

- Cohorte 1 : 4 primates en IM avec ssAAV2/1 rtTA EPO ($1,10E+11$ vg/kg)

- Cohorte 2 : 2 primates en IM avec vecteur scAAV2/8 GFP (1,10E+13 vg/kg)
 - Cohorte 3 : 3 primates en IV avec vecteur scAAV2/8 GFP (1,10E+13 vg/kg)
 - Cohorte 4 : 2 primates en IV avec vecteur adénovirus GFP (2. 10E12 vg/kg)
- n = 11 animaux au total pour ce projet (pas d'augmentation suite à l'amendement).

1-Réduction

La constitution des groupes (n= 2 à 4/groupe) est basée sur notre expérience et le type d'analyses réalisées, et permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Des tests non-paramétriques de type Mann et Whitney seront réalisés.

2- Raffinement

Des protocoles anesthésiques et analgésiques seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale se déroulera sous anesthésie générale. Les prélèvements sanguins seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min). Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces 2 procédures. Les biopsies musculaires et hépatiques se dérouleront sous anesthésie générale et analgésie adaptées (morphiniques).

Pour favoriser les échanges sociaux et le bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 à 6 et en volières dès que possible (hors période de suivi post opératoire). L'état général et l'alimentation seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du Centre de thérapie génique, qui dispose d'un programme d'enrichissement pour les macaques, regroupant un certain nombre d'activités : distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou en hauteur, visionnage de films, mise à disposition de jouets, aménagement de l'habitat.

3-Remplacement

Cette étude aura lieu chez le macaque fascicularis, modèle plus pertinent que le rongeur, qui ne prédit pas totalement l'immunité liée à l'AAV (hôte non naturel de l'AAV sauvage). Les études chez le primate non humain apportent les meilleures connaissances en termes d'efficacité et de toxicité de l'AAV dans un organisme dont le système immunitaire est très proche de celui de l'homme. Ceci ne peut être obtenu *in vitro* et justifie ici notre recours à des animaux.

13430 Le vieillissement est associé à une augmentation de l'inflammation cérébrale et des défauts mnésiques. Ces défauts de la mémoire impactent fortement la qualité de vie des personnes âgées et représente donc un important problème de santé publique. Afin de limiter ces deux composantes, et permettre ainsi de mieux vieillir, il est pertinent de mettre en place des stratégies et de les évaluer. Dans ce contexte, a été remarqué qu'une supplémentation en citrulline, un acide aminé présentant une activité anti-inflammatoire sur le système immunitaire, pouvait conduire à une protection contre les défauts de mémoire.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les effets d'une supplémentation en citrulline sur l'inflammation cérébrale et les défauts mnésiques dans un modèle de vieillissement normal. Notre projet de recherche se déroulera en deux phases. La première étape consistera en une détermination de la dose optimale de citrulline à délivrer sans provoquer une saturation du système. Dans ce but, les souris recevront une eau supplémentée avec 3 doses de citrulline (n=3 souris par dose) pendant 5 jours, puis la quantité de citrulline sera mesurée dans le plasma, les urines, l'hippocampe et le cortex. En parallèle, nous utiliserons également trois souris de 2 mois. Celles-ci seront comparés aux souris contrôles âgées de 15 mois (sans citrulline) afin d'évaluer si la quantité endogène de citrulline et d'arginine varie en fonction de l'âge.

Nous utiliserons ensuite cette dose optimale de citrulline pour déterminer les effets d'une supplémentation sur les fonctions mnésiques et l'inflammation cérébrale. Dans cette optique, des souris de 15 mois recevront de l'eau standard ou supplémentée en citrulline pendant 12 semaines (n=12 souris par groupe, nombre nécessaire et suffisant pour des études statistiques : réduction). Ces animaux seront de plus alimentés avec un régime alimentaire standard ad libitum. Les paramètres métaboliques (prise hydrique, prise alimentaire) seront relevés quotidiennement. Les

animaux seront pesés deux fois par semaine. Suite à cette période de traitements, nous réaliserons une étude comportementale impliquant l'activité locomotrice, l'anxiété, la mémoire à court terme ainsi que l'apprentissage et la mémoire à long terme.

Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 39. Nous avons conçu ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner ».

-La première phase par exemple, nécessitera un petit nombre de souris pour déterminer la dose optimale de citrulline, nous permettant de réduire le nombre d'animaux traités à la dose optimale lors de la seconde partie. De plus, l'ajout de jeunes souris dans la première étape nous permettra d'évaluer l'effet de l'âge sur la quantité endogène de citrulline.

-L'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole et des procédures expérimentales :

La quantité de nourriture et d'eau absorbée sera mesurée quotidiennement et le poids sera évaluée deux fois par semaine. Le bien-être des animaux sera donc évalué de façon complémentaire et quotidiennement en observant leur comportement. Les points limites seront : une perte de poids de plus de 20% du poids initial (sans récupération au bout de 4 jours), l'arrêt de la prise alimentaire (solide et/ou liquide), un état général traduisant une évolution vers la morbidité (hypo-activité, position prostrée, tremblements incessants, ...). En cas de dépassement des points limites, les traitements seront arrêtés, et les animaux seront sortis de l'étude puis mis à mort par une surdose d'anesthésique. Le bien-être des animaux sera également pris en charge lors des procédures expérimentales. Les prélèvements sanguins seront réalisés par une personne expérimentée, détenant les niveaux requis (DU niveau 1 et DU chirurgie expérimentale) et maîtrisant la procédure. Pour cela, les animaux seront conduits individuellement dans une pièce attenante à l'animalerie ou le geste sera effectué. Ils seront préalablement anesthésiés à l'isofluorane 4% et le volume prélevé sera minimal. Les animaux seront maintenus sous surveillance régulière dans les heures qui suivent le prélèvement.

-Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer des modèles qui étudient le comportement et que seule l'expérimentation animale permet d'évaluer des effets de la citrulline sur les fonctions mnésiques. Nous avons choisi le modèle murin C57BL/6J pour sa pertinence dans les approches nutritionnelles, inflammatoires et du vieillissement. En effet, celui-ci présente spontanément des défauts de mémoire et une augmentation de l'inflammation liés à l'âge.

Ce travail permettra de préciser le potentiel thérapeutique de la citrulline dans la prévention de l'inflammation cérébrale et des défauts de mémoire dans le vieillissement normal. A terme, les données de ce travail pourraient permettre d'utiliser la citrulline dans le cadre du vieillissement normal mais aussi dans d'autres pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.

13431 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie cardio-pulmonaire sévère. Elle est caractérisée par une augmentation anormale de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-dessus de 20 mmHg au repos. L'HTAP est caractérisé par une obstruction des artères pulmonaires de petit calibre (diamètre inférieur à 500 μm) conduisant à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. Cette élévation de la PAP aboutie à une hypertrophie cardiaque droite puis à une insuffisance cardiaque et à terme au décès du patient.

Les mutations dans le gène BMPR2 constituent le premier facteur de risque génétique de la maladie. Les malades HTAP qui en sont porteurs développent la maladie plus tôt, présentent une adaptation cardiaque plus faible à l'augmentation de la PAPm et meurent plus tôt de défaillance cardiaque droite.

Les patients deviennent symptomatiques (essoufflement à l'effort) et ne sont diagnostiqués que dans les stades terminaux de la maladie. Il n'est donc pas possible de disséquer l'histoire naturelle du développement de la maladie chez l'homme. C'est pour cette raison que nous travaillerons avec un modèle animal de cette maladie héritable. Le rat nous permettra ainsi d'avoir accès aux stades qui précèdent la maladie.

Pourtant, comprendre comment se met en place l'adaptation cardiaque à l'augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires est un enjeu majeur pour soutenir la fonction cardiaque chez les malades et augmenter leur survie.

Pour comprendre comment se met en place cette adaptation en présence ou en absence de mutation dans le gène *BMP2*, nous allons utiliser des rats porteurs de mutations dans ce gène et les soumettre à divers stress cardiaques pertinents, au travers de modèles animaux d'insuffisance cardiaque validés du point de vue technique et éthique.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées au cours du temps par des méthodes non invasives comme l'échocardiographie, permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation après un dernier bilan (cathétérisme) de leur fonction cardiaque, et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 204 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

Au vu de l'absence de thérapeutique visant le cœur dans l'HTAP, ce projet présente une utilité majeure dans la prise en charge de ces malades.

13432 Touchant 3 à 5% de la population générale, les anévrismes intracrâniens (AIC) sont des malformations des vaisseaux cérébraux susceptibles de provoquer une hémorragie, dont les conséquences peuvent être dramatiques. La rupture d'un AIC entraîne, dans 65% des cas, la mort du patient tandis que la moitié des survivants conservera des séquelles neurologiques et/ou cognitives importantes. Malgré les avancées thérapeutiques, il n'existe à ce jour aucun traitement non invasif efficace pour empêcher la formation et/ou la rupture d'un AIC.

Dans ce projet, nous étudierons l'implication d'ADAMTS-4 (une désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4) dans la formation/rupture des AIC. ADAMTS-4 est une cible d'intérêt pertinente car elle intervient dans deux événements majeurs de la pathogenèse des AIC, à savoir la modulation de l'inflammation et celle de la matrice extracellulaire. Nous testerons par la suite différents inhibiteurs dirigés directement contre ADAMTS-4 ou ses différents substrats. Enfin, nous évaluerons l'intérêt d'ADAMTS-4 comme nouveau marqueur de diagnostic en clinique, par des dosages sanguins et céphalo-rachidiens. Ces études permettront d'approfondir les connaissances actuelles de la pathologie, étape nécessaire pour développer des stratégies thérapeutiques adaptées, ainsi que pour améliorer le diagnostic des AIC, en particulier concernant le risque de rupture.

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

Concernant le principe de remplacement, notre étude ne nous permet pas de nous défaire du modèle murin. Notre choix s'est penché sur la souris, qui est l'espèce animale dont le système vasculaire cérébral a été le plus étudié. Les mécanismes en sont donc globalement établis, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction. Cette étude nécessitera néanmoins 500 souris pour être menée à bien.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. La douleur suite à une injection intracisternale est considérée comme modérée : en effet l'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les

animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ».

Le personnel formé suivra le bien-être des animaux 2 fois par jour, 7j/7. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs : Anévrisme Intracrâniens, ADAMTS-4, Matrice Extracellulaire, Vaisseaux

13433 Les molécules anti-angiogéniques ont démontré un effet important en thérapie anti-tumorale. Cependant, ces traitements ne sont pas efficaces sur tous les types de cancers.

Notre équipe travaille sur une molécule, CD146 soluble, qui est sécrétée par certaines cellules cancéreuses (pancréas, mélanome, colon, rein, ...) et qui possède des propriétés angiogéniques. Nous avons donc généré des anticorps spécifiques de CD146 soluble avec l'objectif de les utiliser comme molécules anti-angiogéniques dans les pathologies tumorales.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent que ces anticorps anti-CD146 soluble pourraient avoir un réel intérêt thérapeutique en bloquant les effets angiogénique, métastatique et anti-apoptotique de la molécule CD146 soluble. Toutefois, il reste à démontrer ses effets sur des modèles animaux de tumeur. Notre programme consiste à tester l'effet de la molécule CD146 soluble et de l'anticorps anti-CD146 soluble, en comparaison avec le bevacizumab. Pour cela, les différents types de cellules cancéreuses humaines seront xéno greffées soit chez des souris nude, soit chez des souris NOD/SCID en fonction de l'efficacité de la prise de greffe. Dans d'autres expériences, des cellules cancéreuses murines seront greffées chez des souris non-immunodéprimées c57bl/6. Nous étudierons les effets de la molécule et des anticorps sur l'angiogenèse et la croissance tumorale mais aussi sur l'apoptose et la dissémination métastatique.

Nous utiliserons un total de 320 souris nude ou NOD/SCID pour réaliser les xéno greffes de tumeurs humaines et 80 souris c57bl/6 pour les greffes de cellules murines, soit 400 animaux au total. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R-Réduction/Remplacement/Raffinement » sera appliquée. Le protocole sera arrêté si l'animal présente un mauvais état de santé ou si la tumeur devient trop importante. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Enfin, les animaux seront hébergés dans une animalerie conventionnelle et un enrichissement adapté sera donné afin de veiller au bien être des animaux.

13434 De nos jours, compte tenu d'une population vieillissante, de nombreuses personnes souffrent d'hémorroïdes. Ceci constitue un problème médical et socio-économique majeur. La pathologie hémorroïdaire est une affection bénigne. Le traitement est essentiellement symptomatique. De nombreux facteurs sont à l'origine de ces troubles comme la constipation, la sédentarité, la grossesse, un régime pauvre en fibres, l'obésité, etc...

Ce projet a pour objectif d'évaluer les effets anti-hémorroïdaires et/ou anti-inflammatoires bénéfiques éventuels de nouveaux candidats médicaments.

Actuellement, les preuves d'efficacité des traitements médicamenteux de la pathologie hémorroïdaire sont insuffisamment documentées. On distingue des médicaments par voie orale ou des médicaments par voie locale (topique).

Le choix de l'espèce animale s'est porté sur le rat car il existe déjà un modèle animal d'anite correspondant à une inflammation de la marge de l'anus. Ce modèle permet d'étudier la réaction inflammatoire au niveau de l'anus. Le principe du modèle consiste à induire une inflammation de l'anus par application locale d'une formulation irritante. Cette application induit une réaction inflammatoire caractérisée par un œdème et des lésions de la muqueuse. Les candidats médicaments sont administrés soit en préventif (avant application de la formulation irritante) soit en curatif (après exposition de la formulation irritante). Il n'existe pas de modèles alternatifs permettant d'étudier la réaction inflammatoire. Les études des effets sur le modèle d'anite visent donc à caractériser les propriétés thérapeutiques de nouveaux candidats médicaments dans le cadre de pathologies inflammatoires au niveau de l'anus.

La dose d'agent irritant est choisie de façon à induire une inflammation réversible, limitée dans le temps (5 jours) et en intensité (légère).

Ce modèle est nécessaire pour objectiver directement les effets de molécules et mimer au plus près les conditions d'utilisation clinique. Ces études sont en général réalisées sur 6 groupes de 10 à 12 animaux au maximum. Ces effectifs par groupe correspondent au nombre minimum d'animaux nécessaires permettant de révéler les effets recherchés avec la sensibilité statistique requise dans ce type d'étude car une grande variabilité des paramètres mesurés est attendue. Ce type d'étude est peu fréquent. Les prévisions sont d'une étude par an sur 5 ans, soit un total de 360 rats pour 5 ans.

Ce projet est classé avec un degré de sévérité modérée en se référant aux douleurs hémorroïdaires chez l'homme.

Ce projet est requis par les autorités réglementaires en préalable aux essais des protocoles thérapeutiques chez l'homme.

13435 La sédentarité augmente le risque de développement de maladies cardiovasculaires et de diabète ainsi que d'autres pathologies associées à une augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma. Les principales cytokines pro-inflammatoires sont IL-6, TNF-alpha et IL-1 beta. La production de ces médiateurs cellulaires peut être régulée par l'action de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4 et IL-10. Le muscle squelettique est une source importante de ces deux catégories de cytokines avec lors de la contraction musculaire une augmentation de la production d'IL-6. De plus, un exercice physique violent peut être considéré comme un facteur de stress menant à des syndromes inflammatoires. En revanche, un entraînement chronique peut médier ces réactions inflammatoires par la production de cytokines à activités anti-inflammatoires.

L'utilisation de compléments alimentaires peut aider à la récupération entre deux séances d'entraînement, d'autant plus si ces compléments alimentaires apportent des molécules à activité anti-oxydante. Les microalgues, sont des microorganismes qui produisent de nombreuses molécules à activités biologiques connues pour avoir des effets sur la prévention de l'installation de maladies cardiovasculaires pouvant être associées à des dyslipidémies ou à un stress cellulaire. Actuellement, de nombreux industriels cherchent à valoriser ces microalgues en les utilisant comme compléments alimentaires afin de valider leur efficacité.

L'objectif de cette étude est de tester deux extraits de microalgues apportés dans le régime alimentaire de rats au cours d'un entraînement d'endurance, afin de voir si les molécules d'intérêt contenues dans ces microalgues, ont une action sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Le modèle rat est retenu pour cette étude. L'objectif étant de pouvoir transférer les résultats qui seront obtenus à la nutrition humaine, un modèle murin est requis. Etant donné qu'un certain nombre d'analyse sera effectué sur le sang et sur différents tissus (muscle squelettique et foie), les prélèvements effectués sur le rat permettront d'avoir des quantités suffisantes afin de mener à bien cette étude. Pour cela, quarante huit rats mâles Wistar adultes vont être soumis pendant 8 semaines à un régime standard d'entretien supplémenté avec un complément alimentaire contenant un extrait de microalgue. A ce régime alimentaire, va être associé un protocole de course sur tapis roulant, équivalent à un entraînement modéré d'endurance. Six lots vont être constitués avec huit animaux par lot: un lot contrôle, un lot extrait microalgue 1, un lot extrait microalgue 2, un lot contrôle+entraînement, un lot extrait microalgue 1+entraînement, un lot extrait microalgue 2+entraînement.

Après une semaine d'adaptation consistant à apprendre à courir aux rats, un protocole permettant d'augmenter graduellement le temps de course ainsi que la vitesse, sera mis en oeuvre afin d'atteindre une vitesse de 20 m/min pendant 20 minutes, 5 jours par semaine. Afin de minimiser tout phénomène de stress ou d'angoisse, des grilles d'évaluations sont établies lors du protocole d'entraînement. Le suivi de l'entraînement est effectué par du personnel qualifié et de façon ininterrompue. Dès l'apparition d'un stress (modification de la physionomie du visage), d'une posture non adaptée (voûtée ou prostrée), d'un comportement inhabituel (agitation) ou d'une appréhension

vis à vis de la course, la séance d'entraînement est interrompue. Si cette situation se présente à nouveau lors d'une nouvelle séance d'entraînement, le rat est exclu du protocole et réversé dans le lot contrôle. Le tapis de course est muni de 5 pistes séparées par des parois en plexiglas, ce qui permet à chaque rat de voir son congénère. Le système est adapté au rat, ce qui évite tout risque de coincement de la queue ou d'une patte. En cas de plaie éventuelle, un antiseptique et un cicatrisant sera posé et le rat sera dispensé d'entraînement jusqu'à récupération de son intégrité physique.

Les rats sont hébergés dans une animalerie en conditions contrôlées (éclairage, température, hygrométrie) et dans le respect de la méthode des 3R. Un suivi de soin journalier sera effectué (suivi de la prise alimentaire, évaluation de l'eau de boisson consommée) ainsi qu'un suivi deux fois par semaine du poids corporel des animaux. Au cours de ces visites, il sera aisé d'observer un comportement éventuel non approprié tel qu'un comportement agressif, un aspect physique pouvant être un signe de carence ou de domination. Le milieu sera enrichi en objets permettant aux animaux de créer un environnement propice à leur développement et à leur épanouissement.

A la fin du protocole de huit semaines, les rats sont anesthésiés par un mélange kétamine/xylazine (Imalgène 1000 100 mg/kg et xylazine 2% 10 mg/kg). Une fois anesthésiés, la totalité du sang est prélevée au niveau de l'aorte abdominale. Le foie et le muscle gastrocnémien sont prélevés. Le dosage des cytokines pro- et anti-inflammatoires sont mesurées par méthodes ELISA au niveau du plasma. Un dosage des réserves en lactate et en glycogène est aussi effectué au niveau des tissus hépatiques et squelettiques par méthodes spectrophotométriques.

13436 Les maladies atopiques affectent 40% de la population mondiale, et sont un enjeu de santé public. La marche atopique décrit la succession des maladies atopiques qui apparaissent durant l'enfance. La dermatite atopique (DA), souvent associée à l'allergie alimentaire (AA), est la plus fréquente et la plus précoce des allergies. La DA est une maladie multifactorielle due à l'association de facteurs génétiques et environnementaux. Le rôle précoce d'une anomalie de diversité du microbiote a été mis en évidence. Cependant, la physiopathologie de la marche atopique n'est pas complètement connue et il n'existe aucune stratégie préventive. Or, la grossesse représente une fenêtre d'intervention optimale dans la régulation du processus allergique à travers une modulation des systèmes immunitaire et microbien du fœtus, ce qui en fait une piste prometteuse pour la prévention de l'allergie. Notre étude préclinique a montré chez la souris une diminution de l'AA après une exposition aux prébiotiques durant la gestation et l'allaitement.

L'objectif de ce projet sur 5 ans est de comprendre les mécanismes de l'effet préventif des prébiotiques sur l'AA seule et la DA associée à l'AA dans deux modèles murin afin de nous permettre d'appréhender la mécanistique d'un essai clinique dont le but est de déterminer l'efficacité d'une supplémentation anténatale maternelle en prébiotiques sur l'occurrence de l'allergie. Pour ce faire, nous utiliserons deux modèles murins de sensibilisation: 1/ un modèle de sensibilisation cutanée et de challenge oral aux gliadines de blé afin de reproduire les signes cliniques de la DA associée à une AA ; 2/ un modèle de sensibilisation intrapéritonéale et de challenge oral aux gliadines de blé afin de reproduire l'AA seule. Ces modèles murins nous serviront à tester la stratégie préventive d'une supplémentation anténatale en prébiotiques GOS/Inuline et d'identifier les biomarqueurs de la pathologie.

Dans cette expérimentation des souris Balb/c reproductrices mâles et femelles seront exclusivement nourries avant et pendant la gestation avec un régime standard ou enrichi en prébiotiques GOS/Inuline.

Les mères gestantes seront conservées et les souriceaux utilisés pour évaluer l'impact du prébiotique sur les paramètres associés à l'AA seule ou à la DA associée à l'AA dans la descendance. A la naissance des souriceaux, les deux groupes de mères reviendront à un régime standard ainsi que les souriceaux après sevrage.

Ensuite, les souriceaux à 3 semaines de vie seront soumis aux deux types de sensibilisation : cutanée et intrapéritonéale. Pour la sensibilisation cutanée, une fois par semaine pendant 6 semaines, les souris seront épilées sur le ventre à la crème épilatoire puis exposées à 0. 1mg de

gliadines désamidées + 10µg de choléra toxine (10 souris/groupe). Dans le cas des sensibilisations intrapéritonéales, les souris recevront 2 injections de 10µg de gliadines désamidées + 100µl d'aluminium hydroxyde à 10 jours d'intervalles (10 souris/groupe).

1 semaine après les périodes d'exposition cutanée ou intrapéritonéale, les souris seront challengées oralement par gavage avec 50mg (sensibilisation cutanée) ou 20mg (sensibilisation intrapéritonéale) d'allergène.

Lors du protocole les selles et le lait seront prélevés. Puis, au terme de 18 semaines de protocole, les souris seront sacrifiées pour prélever les organes et réaliser les analyses. Nous évaluerons la physiologie des barrières (intestin et peau), le microbiote et la composition du sérum (Immunoglobulines, histamine, mMCP1). Les paramètres immuns seront étudiés également par l'analyse des populations cellulaires immunitaires innées et adaptatives au niveau de l'intestin, de la peau et au niveau systémique (rate et sang). La composition du lait maternel (microbiote et oligosaccharides) sera étudiée. Durée : 36 mois.

Nous utiliserons 270 souris reproductrices dont 180 femelles reproductrices et 90 mâles reproducteurs divisées en deux groupes : un groupe contrôles (90 femelles +45 mâles) et un groupe prébiotique (90 femelles +45 mâles). Dans ces conditions nous espérons obtenir au moins 80 souriceaux femelles en tout (soit 40 par type de sensibilisation).

Le nombre important de souris est expliqué par la difficulté des prélèvements à effectuer ainsi que la quantité de tissu et de cellule très faible. L'analyse demande également de séquencer les manipulations pour veiller au bien être des souris et au bon déroulement des expérimentations scientifiques. Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

Notre étude respectera la règle des 3R:

- Réduire : Nombre d'animaux réduits au minimum pour être statistiquement relevant
- Remplacer : Impossible de prendre des mesures de remplacement
- Raffinement : Hébergement adéquate, utilisateurs expérimentés, utilisation d'anesthésique sur tapis chauffant pour les sensibilisations et les prélèvements de lait.

13437 Avec plus de 80% de la mortalité cardiovasculaire survenant chez les individus de plus de 65 ans, le vieillissement est un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires. Il est à noter que l'hypertension artérielle, la rigidité artérielle et l'hypercoagulabilité (la coagulation exagérée) augmentent avec l'âge pouvant entraîner des complications telles que l'athérosclérose et l'accident vasculaire cérébral. Il est donc crucial de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le vieillissement artériel physiologique (normal) ou physiopathologique (lors des maladies suscitées), en particulier au niveau de l'hémostase. Nous avons des données originales dans un modèle de vieillissement retardé, le rat taupe nu (NMR, longévité >30 ans). Nous avons des données montrant que le NMR âgé ne développe pas de phénotype prothrombotique avec l'âge en utilisant des tests sophistiqués. Pour en comprendre les mécanismes, il est essentiel de comparer les données obtenues dans ce modèle avec celle obtenues dans une espèce animale proche le rat et la souris normal et chez l'homme. Pour cela une seule procédure sera effectuée. Un prélèvement intra-cardiaque de sang chez les animaux anesthésiés à l'isoflurane sera effectuée avant la mise à mort délivrée par excès d'isoflurane.

Il est prévu d'utiliser 20 rats et 20 souris au total. Dans le cadre du respect des 3 R :

- Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de tests d'hémostase seront effectués sur le sang d'un même animal. De plus, notre expertise nous permet de limiter à 10 animaux par groupes et des tests statistiques non paramétriques adaptés pour des petits effectifs seront utilisés pour analyser les données.
- Durant le temps de vie des animaux, si un ou plus de ces points limites sont observés, l'animal sera mis à mort : à savoir une perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours, un isolement, des yeux fermés, un dos voûté, le poil hérissé, une immobilité, refus de s'alimenter, des yeux et un abdomen creux, une automutilation.

- Pour le raffinement, les animaux ne seront pas manipulés dans la même pièce que celle où ils sont hébergés. Les rats ou les souris seront hébergés de 1 à 3 par cages individuellement ventilées. Ils seront nourris ad libitum avec les croquettes. La litière sera changée une fois par semaine. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

13438 Le Syndrome de Down (SD) ou Trisomie 21 (T21) est la première cause de retard mental d'origine génétique. Le SD est lié à la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21 et touche 1 naissance sur 600 à 800. Il se caractérise par des déficiences intellectuelles : les personnes atteintes de SD ayant des difficultés d'apprentissage et de mémorisation qui sont liées à des défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. L'amélioration des soins apportés aux personnes atteintes du SD a permis d'augmenter considérablement leur espérance de vie. Cette augmentation a mis en évidence chez ces personnes un risque accru de développer, de façon précoce, une maladie d'Alzheimer (MA). En effet, il a été constaté que près de 100% des personnes atteintes de SD présentent les caractéristiques de la MA à 40 ans. Cependant, les mécanismes impliqués dans le développement d'une MA dans un contexte de trisomie ne sont pas connus.

Nous souhaitons donc étudier les mécanismes de la maladie d'Alzheimer dans un contexte de trisomie. Pour cela nous avons créés un nouveau modèle de rat et de souris trisomiques qui se veut plus proche des conditions observées dans la pathologie humaine. Nous souhaitons maintenant réaliser une étude moléculaire dans le cerveau de ces animaux afin de voir si ce modèle présente bien les caractéristiques de la MA. Cela nécessite une perfusion de l'animal, procédure réalisée sous anesthésie générale afin qu'aucune douleur ne soit générée. Il s'agit de la seule technique nous permettant de récupérer le cerveau dans des conditions optimales pour les études que nous souhaitons réaliser par la suite.

L'intérêt d'utiliser à la fois des modèles souris et rat est que cela pourrait permettre la généralisation des résultats obtenus dans le cas où ils seraient similaires entre les deux espèces. En effet, comme on le sait, il peut exister des différences entre les espèces, ce qui rend important la comparaison des résultats obtenus avec des organismes différents.

Réduction : Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux (172) estimé pour avoir des résultats scientifiquement interprétables. Dans le but d'utiliser l'ensemble des animaux produits et de prendre en compte une éventuelle dysmorphie sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement : Aucune douleur n'est attendue. En effet, ces animaux ne feront l'objet que d'une seule procédure réalisée sous anesthésie générale. Par ailleurs, tout au long de leur vie, les animaux seront hébergés en groupe (par 2 pour les rats et par 4-5 pour les souris) et disposeront d'un élément d'enrichissement. Ils seront suivis quotidiennement, si un animal présente des signes de douleur ou de mal être, il sera présenté au vétérinaire, puis si un traitement est envisageable, il sera mis en place. Dans le cas contraire, l'animal sera mis à mort.

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux pour les études concernant le cerveau. En effet, il n'existe pas encore de modèle *in vitro* ou autre permettant de réaliser de la recherche fondamentale dans ce domaine.

13439 Plusieurs études montrent que le glyphosate, substance active de l'herbicide, Round up présente des effets néfastes sur la santé animale. Cependant, ces effets et les mécanismes moléculaires ne sont pas clairement élucidés chez la volaille. Notre projet a pour but de déterminer l'influence du Round up sur le métabolisme (poids, engraissement, paramètres plasmatiques), les performances de ponte (nombre et qualité des œufs), la fertilité (mortalité embryonnaire, taux d'éclosion) et les performances de la descendance (indice de consommation, viabilité des poussins) chez la poule reproductrice. Cent quatre-vingt animaux seront répartis dans 5 lots comme suivant : 3 lots de 20 animaux seront dédiés pour l'étude du métabolisme pendant 35 jours et 2 lots de 60 animaux seront utilisés pour les études sur les performances de ponte et la fertilité de 19 à 35 semaines et l'impact sur la descendance sur 10 jours. Pour ces deux derniers lots, à 25 et 30 semaines d'âge, les poules seront inséminées artificiellement avec du sperme issu de coq de même type génétique et d'élevage classique (n=20 coqs). Les œufs seront collectés pendant 3 semaines consécutives avec mise en

incubation régulière après 7 jours de collecte. La fertilité, la mortalité embryonnaire (précoce et tardive) et le taux d'éclosion seront enregistrés au couvoir. Après éclosion, les poussins seront élevés collectivement jusqu'à 10 jours d'âge afin d'évaluer l'impact de l'exposition au Round up des mères sur les performances des poussins (mortalité, croissance et consommation d'aliment). Un suivi métabolique (analyse de paramètres plasmatiques) de la naissance à 10 jours sera réalisé sur 40 poussins (n=20 issus de chacun des 2 lots des mères). L'effectif total des animaux soumis à une procédure est donc de 220 (180 poules + 40 poussins).

La règle des 3R a été respectée comme suit :

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

13440 La polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique est une pathologie neuromusculaire hétérogène qui affecte les nerfs périphériques et entraîne des faiblesses musculaires voire des paralysies, mais n'est pas associée à des douleurs neuropathiques. Jusqu'à présent aucun biomarqueur ne permet de diagnostiquer ces pathologies.

Nous avons récemment découvert que des anticorps ciblent des molécules d'adhérences impliquées dans la formation des nœuds de Ranvier qui permettent la propagation rapide des influx nerveux le long des nerfs. Notre but est de déterminer comment les anticorps perturbent la conduction et par la même occasion comment les molécules d'adhérence sont adressées dans la cellule de Schwann.

Le développement de modèles animaux est donc crucial pour mettre en évidence la pathogénicité des anticorps et découvrir les mécanismes neuro-immuns complexes responsables de ces pathologies. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation des modèles animaux. Nous proposons ici de réaliser plusieurs procédures chez la souris et le rat Lewis qui peuvent entraîner des faiblesses musculaires, mais n'attendrons pas le stade de la paralysie et ne seront pas associées à de la douleur neuropathique. Nous proposons d'utiliser 160 rats et 160 souris. Etant donné que les résultats sont peu prévisibles pour certaines procédures, nous avons surestimé le nombre d'animaux nécessaires. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au fur et à mesure de l'étude. Notamment, nous réaliserons les études électrophysiologiques et morphologiques sur les mêmes animaux afin de diminuer leur nombre. Pour certaines procédures, les animaux devront être isolés afin d'éviter que leurs congénères ouvrent les plaies (retirent les points de sutures) ou abiment les dispositifs servant à l'injection d'anticorps. Afin d'éviter toute détresse, les animaux seront placés dans un environnement enrichi et dans des cages contenant une épaisseur suffisante de copeaux de bois afin qu'ils puissent s'y cacher. De plus, les animaux bénéficieront d'une surveillance et d'un examen clinique quotidiens

13441 Le statut sanitaire des colonies de souris de laboratoire utilisées comme modèles animaux pour les recherches scientifiques et biomédicales conditionne à la fois leur état de santé, leur bien-être, et leur pertinence en tant que modèle.

L'évolution des connaissances concernant les pathogènes spécifiques des rongeurs, et des contaminations accidentelles, imposent un nouveau programme de décontamination par transfert d'embryons de l'ensemble des modèles génétiques murins utilisés dans un centre de recherche biomédicale pour mieux comprendre des maladies génétiques et des pathologies tumorales chez l'homme, et pour évaluer des approches thérapeutiques répondant à ces maladies.

Le projet consiste à décontaminer l'ensemble des modèles murins originaux présents dans le centre de recherche pour éliminer de la colonie les agents microbiologiques qui pourraient interférer avec

leur utilisation comme modèle animal. Le transfert d'embryons avant implantation chez des femelles receveuses indemnes de contaminants permet d'obtenir des animaux assainis pour chacune des lignées.

Ce transfert d'embryons implique des procédures de stimulation hormonale des femelles donneuses par injection pour la production des embryons. Des femelles pseudo-gestantes, obtenues par accouplement avec des males stériles vasectomisés sont utilisées comme receveuses. Le transfert d'embryons est réalisé par voie chirurgicale, après une procédure de décontamination des embryons par lavages successifs. Les procédures chirurgicales (vasectomie et réimplantation) seront réalisées sous anesthésie générale et avec analgésie post opératoire pour éviter toute souffrance aux animaux.

Le remplacement concerne les phases de décontamination proprement dites des embryons, réalisées ex-vivo par lavage, l'objectif étant l'amélioration de l'utilisation de modèles génétiques pré-existants.

Le raffinement des procédures inclura des durées d'intervention réduites, la mise en place de traitements analgésiques post opératoires systématiques, l'utilisation de points limites systématiques précoces.

La réduction du nombre d'animaux conduira à la réalisation d'une partie seulement des transferts prévus si la transmission des génotypes d'intérêt est obtenue plus rapidement.

Un total de 300 modèles génétiques murins originaux d'intérêt sera redérivé dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) pour l'utilisation d'un nombre maximum de 4935 souris adultes.

13442 La radiothérapie des mélanomes de l'œil donne de très bons résultats locaux en termes de contrôle local de la tumeur. Cependant, ce contrôle tumoral est obtenu souvent au prix d'effets secondaires de l'irradiation sur les tissus sains oculaires notables qui altèrent la qualité de vie des patients et dans bien des cas responsables d'une perte de la vue, d'un œil sec, de glaucome...

Cette radiothérapie des mélanomes de l'œil est réalisée dans les centres de protonthérapie, car la distribution de dose en profondeur des rayonnements médicaux protons est tout à fait adaptée pour traiter ce genre de pathologie.

Par ailleurs, plusieurs travaux récents réalisés avec un faisceau d'électrons ont démontré que pour une même dose administrée à un tissu sain chez la souris, la toxicité de l'irradiation était fortement diminuée lorsque cette dose était délivrée à très haut débit de dose, autrement dit en un temps très bref avec une efficacité anti-tumorale identique à celle obtenue après irradiation avec un débit de dose classique utilisé en radiothérapie. Cette découverte faite chez la souris, constitue à l'évidence une voie de recherche prometteuse en radiothérapie.

Avant de mettre au point des protocoles thérapeutiques utilisant ces modalités à haut débit de dose pour traiter des patients porteurs de mélanome de l'œil en protonthérapie, il convient évidemment de s'assurer qu'avec ce type de tumeur et ce type d'irradiation (protons au lieu d'électrons), la dose délivrée à haut débit est tout aussi efficace que celle délivrée à un débit conventionnel utilisé en routine clinique.

Le présent projet, se propose de vérifier que l'irradiation en protonthérapie à haut débit est tout aussi efficace sur des greffes tumorales de mélanomes uvéaux humains sur souris.

L'expérimentation prévoit de greffer de petits fragments de mélanome uvéal chez la souris puis d'irradier un lot d'animaux au niveau de la greffe tumorale avec un faisceau de proton à débit conventionnel ou bien avec un faisceau à très haut débit de dose.

Le résultat espéré est d'obtenir une efficacité anti-tumorale identique dans les deux groupes de souris. S'il est obtenu, il permettra la poursuite du programme qui consistera dans le cadre d'un nouveau projet à démontrer qu'avec les protons, le haut débit de dose est moins toxique sur la rétine d'un plus gros mammifère. L'objectif final est bien sûr de pouvoir proposer aux patients cette nouvelle modalité d'irradiation de façon à obtenir le même taux de contrôle tumoral mais avec une toxicité oculaire nettement réduite.

Le passage sur le modèle animal fait suite à une série d'études *in vitro* qui ont démontré que le gain de l'irradiation à haut débit n'était pas observable au niveau cellulaire alors qu'il est indéniable au niveau tissulaire. C'est pourquoi le recours au modèle animal est indispensable et que nous ne disposons pas d'alternatives pertinentes.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 125 souris sur 5 ans. Ce nombre a été défini à l'aide d'outils statistiques de façon à limiter les animaux utilisés tout en s'assurant d'obtenir des résultats exploitables.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

Leurs conditions d'hébergement sont optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de raffinement comme des rondins de bois ou de coton dans les cages.

13443 L'IRM (imagerie par résonance magnétique) permet d'obtenir des images dans les trois directions de l'espace avec une résolution de l'ordre de quelques dizaines de microns. C'est une technique qui n'utilise pas de rayonnements ionisants et ne nécessite pas d'injection d'éléments radioactifs. Elle utilise seulement des champs magnétiques et des ondes radio fréquence.

La plupart du temps, l'IRM se suffit à elle-même mais, dans environ 30% des cas, le contraste naturel entre les différents tissus à analyser n'est pas suffisant et nécessite l'injection d'un agent de contraste. Ils permettent d'augmenter le contraste et la spécificité de la technique. Actuellement plus de 30% des examens IRM sont réalisés avec une injection d'agents de contraste. Injectés le plus souvent par voie intraveineuse (I. V), ils modifient les propriétés magnétiques des tissus où ils se fixent ; ce qui modifie l'intensité du signal sur les images. Les agents de contraste utilisant des lanthanides créent une augmentation du signal alors que les agents de contraste à base d'oxyde de fer créent une diminution du signal.

Ce projet vise à étudier par IRM *in vivo* chez la souris différents agents de contraste synthétisés par notre équipe et nos collaborateurs pour visualiser leur biodistribution dans la souris, quantifier leur fixation dans différents organes de stockage (rein, rate, foie) et suivre leur évolution au cours du temps (excrétion)

Les agents de contraste qui seront synthétisés partent tous de la structure des agents commerciaux utilisés en routine clinique. Ils ont donc été approuvés pour leur mise sur le marché. Aucun dommage n'est donc attendu sur la souris.

Les souris seront anesthésiées pendant la procédure d'imagerie. Des images seront réalisées avant et après l'injection d'agent de contraste par voie intraveineuse. La durée du protocole d'imagerie est de 2 heures maximum.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale:

Remplacement: le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement: les animaux sont observés scrupuleusement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. L'IRM est une technique d'imagerie non invasive, indolore et atraumatique. L'IRM est une technique d'imagerie non invasive, indolore et atraumatique. Aucun point limite n'est prévu car l'expérience d'une durée de 2h max est une procédure sans réveil.

Réduction: le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

200 souris seront utilisées dans l'étude

13444 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des motoneurons (cellules nerveuses qui contrôlent les muscles) accompagnée d'une atrophie musculaire et de paralysie, puis par le décès des patients, trois à cinq ans après diagnostic.

Jusque très récemment, la SLA était considérée comme une maladie spécifique du motoneurone. Il apparaît maintenant que le métabolisme (utilisation du glucose (sucre) et des lipides (graisses) pour produire de l'énergie) joue un rôle important dans le développement et la progression de la pathologie. En effet chez les malades atteints de SLA, le métabolisme est déjà altéré avant l'apparition des premiers symptômes moteurs. L'organisme utilise alors des lipides à la place du glucose tout en produisant moins d'énergie.

A ce jour, en dehors de traitements symptomatiques peu efficaces, aucun traitement curatif n'est disponible. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques est essentiel.

L'objectif de ce projet est de tester 2 molécules capables de diminuer l'utilisation des lipides et de stimuler l'utilisation du glucose pour corriger les défauts métaboliques observés dans la SLA. Ces deux molécules sont déjà utilisées en clinique pour traiter d'autres pathologies.

Pour cette étude, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées modèles de SLA qui développent des symptômes cliniques comparables à ceux observés chez l'Homme et présentent donc, elles aussi, les mêmes atteintes métaboliques.

Cette étude nous permettra de déterminer si ces molécules-médicament sont capables de ralentir la progression de la maladie voire d'empêcher son développement. La plus efficace pourrait alors rapidement être testée chez le patient.

Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 877 souris sur 5 ans.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée afin d'optimiser au mieux les protocoles, de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie.

Remplacement : La SLA est une maladie d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'aspect intégré et comportemental de ces pathologies et leur mise en place progressive. Nous avons donc besoin de recourir à des modèles animaux qui présentent, en outre, une organisation du système nerveux proche de celle de l'homme pour réaliser ce projet de recherche.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux dans ce projet, les animaux destinés aux analyses biochimiques ou histologiques seront au préalable inclus dans les études comportementales et fonctionnelles. Le nombre de souris tient compte des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats ainsi que de la variabilité interindividuelle de ces modèles génétiques.

Raffinement : Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, matériel de nidification, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non à la pathologie étudiée afin qu'il puisse être pris en charge. Des points-limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis. De plus nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge analgésique pour les études électromyographiques.

13445 La microcorie congénitale (MCOR) est une maladie ophtalmologique, héréditaire, de transmission autosomique dominante. S'exprimant dès la naissance, elle est caractérisée par une absence totale ou partielle du muscle dilatateur de l'iris et par l'observation de micro-pupilles qui ne réagissent que peu, voire pas du tout, aux variations de l'intensité lumineuse. Elle peut être responsable de malformations du segment antérieur de l'œil pouvant entraîner des troubles de la réfraction (myopie, astigmatisme) et un glaucome juvénile. Cette pathologie est à l'origine d'un double handicap visuel ; les patients souffrent à la fois d'une cécité nocturne et d'une photophobie.

L'analyse génétique de nos familles de patients a montré que le gène responsable a été localisé sur le chromosome 13 en 13q31-32.

En absence d'échantillon biologique (Iris humain), il est nécessaire de créer et d'analyser des modèles animaux adaptés qui permettront de caractériser la fonction de gènes candidats impliqués

dans le développement oculaire et de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie. La génération d'une lignée transgénique MCOR qui sera porteuse de la plus petite délétion trouvée chez les patients permettra une analyse complète sur le plan phénotypique (Absence de dilatation de la pupille, défaut de développement du muscle dilatateur de l'iris, anomalie de l'angle irido-cornéen) ainsi que sur le plan moléculaire (étude des gènes candidats). Dans un deuxième temps nous utiliserons cette lignée de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans le développement oculaire.

La création de lignées de souris génétiquement modifiées nécessite l'utilisation de très jeunes embryons (de 0,5 à 3,5 jours), obtenus par accouplements des femelles après super ovulation par injection d'hormones, et réimplantés par voie chirurgicale chez une mère-porteuse. Afin d'éviter toute souffrance, la chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus.

Les souris subiront à l'âge adulte un examen ophtalmologique indolore mais qui trouble un peu la vision. Afin d'éviter tout stress les souris seront mises dans des cages isolées jusqu'à récupération de l'acuité visuelle.

Les analyses *in vitro* réalisées sur plusieurs modèles cellulaires ne suffisent pas en ce qui concerne les études moléculaires et surtout phénotypiques.

Le nombre d'animaux nécessaires à la création de cette lignée et à la validation du phénotype par étude pupillométrique de l'iris est évalué à 89 souris, mais nous essayerons de réduire leur nombre au maximum.

Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la microcorie congénitale. Cette affection offre un excellent modèle pour comprendre le développement irien et donc les facteurs prédisposant au glaucome, une maladie commune constituant la deuxième cause de cécité dans les pays industrialisés avec 10% d'individus touchés après l'âge de 70 ans.

Motif de l'amendement: Notre première lignée ayant permis de mettre en évidence un mécanisme responsable de la pathologie, une deuxième lignée, porteuse d'une délétion de la même région mais de taille réduite (9kb) et n'emportant que 3 éléments régulateurs de l'expression des gènes (CTCFs) permettra de voir si la seule dérégulation entraînée par cette absence est responsable de la Microcorie. De même une troisième lignée sera créée (DCT), emportant 20 kb dans une autre région régulatrice de notre gène cible. Ces deuxièmes et troisièmes lignées seront créées par la même technique et les 2 mêmes procédures. Un examen pupillométrique sera également pratiqué pour chacune de ces lignées. Le nombre d'animaux sera donc au total évalué à 267 souris, mais nous essayerons de réduire leur nombre au maximum.

13446 La greffe de cellules souches hématopoïétiques est le traitement curatif de nombreux types de cancers hématologiques. Son objectif est de reconstituer un système immunitaire sain et d'éliminer les cellules malignes. L'efficacité de ce traitement est néanmoins limitée par la maladie du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease, GVHD) qui est causée par les lymphocytes du donneur, qui reconnaissent comme étrangers les tissus du receveur. La GVHD représente l'une des causes principales de morbidité et mortalité associées. Cette maladie comporte une forme aiguë et une forme chronique. Si la forme aiguë est assez bien contrôlée par les immunosuppresseurs, la toxicité à long terme de ces molécules impose de trouver de nouveaux traitements alternatifs ou associés. La forme chronique de la maladie, qui se manifeste à la suite de la phase aiguë, répond mal aux immunosuppresseurs et est responsable d'une morbidité à long terme et d'une mortalité qui peut atteindre 30% des patients. Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles stratégies de réduction de la GVHD dans ses deux formes aiguë et chronique.

Ce projet vise à évaluer la capacité d'une thérapie cellulaire avec diverses populations de progéniteurs hématopoïétiques à réduire l'intensité de ces maladies et la mortalité qu'elles entraînent. Cette évaluation se fera dans deux modèles distincts de GVHD chez la souris : la forme aiguë et la forme chronique. Ces modèles précliniques de référence, dans lesquels la greffe de moelle osseuse se fait par injection intra-veineuse après irradiation, permettent d'injecter aux souris,

également par voie intra-veineuse, différents types de cellules progénitrices hématopoïétiques, préalablement stimulées *in vitro* ou *in vivo*, afin d'en évaluer les propriétés protectrices et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leur effet protecteur.

En conformité avec les exigences 3R :

- Des expériences *in vitro* et des modèles *in vivo* d'autres types de maladies, déjà explorés, ont permis de sélectionner des populations de progéniteurs à fort potentiel immunorégulateur (remplacement)
- Des lots les plus réduits possibles d'animaux seront utilisés pour permettre la validité statistique des données obtenues et un même groupe contrôle sera utilisé pour 3 groupes expérimentaux à chaque expérience (réduction)
- Une surveillance régulière sera mise en place et des points limites appropriés définis qui permettront de mettre fin à l'expérimentation de façon anticipée (raffinement)
- Les injections rétro-orbitales auront lieu sous anesthésie (raffinement)

Le nombre total d'animaux est estimé à 3228 souris pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur 5 ans. Ce nombre reflète l'étude approfondie de l'effet des 3 types de progéniteurs dans les 2 modèles de GVHD, caractérisés par une grande variabilité des scores cliniques des animaux individuels, nécessitant de ce fait des lots importants d'animaux.

Les résultats de ce travail devraient permettre de proposer une nouvelle thérapie cellulaire capable, soit par elle-même, soit combinée avec les immunosuppresseurs, de réduire efficacement et à long terme la GVHD et ainsi d'améliorer le pronostic des greffes de cellules souches hématopoïétiques chez les patients cancéreux.

13447 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par la perte de cellules nerveuses (appelées « neurones moteurs) qui contrôlent les muscles. Cette perte de neurones moteurs entraîne une atrophie musculaire et une paralysie progressive menant au décès du patient. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif.

Dans la SLA mais également lors des processus de dénervation musculaire il existe une altération du métabolisme des lipides. Notre hypothèse est que la modulation des lipides pourrait permettre le maintien du dialogue neurone moteur-muscle dans les situations pathologiques. Dans ce projet, nous allons tester une molécule capable de moduler le métabolisme des lipides chez la souris non-transgénique après lésion du nerf sciatique. La lésion du nerf sciatique provoquant une dénervation des muscles, ce projet nous permettra de déterminer si la molécule favorise la récupération fonctionnelle après lésion du nerf et si elle accélère le retour d'une motricité normale. Si les résultats sont positifs, cette molécule pourrait être testée dans le traitement de la SLA afin de favoriser le maintien et/ou la régénération des connections entre les neurones moteurs et les muscles.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie.

Remplacer : la molécule sélectionnée a été caractérisée au préalable *in vitro* pour son activité et ses caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de son effet sur la récupération fonctionnelle après lésion d'un nerf n'est aujourd'hui réalisable que sur l'animal entier.

Réduire : Compte tenu de la variabilité interindividuelle, le nombre d'animaux est de 15 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables et robustes en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi (matériel de nidification, bâton à ronger), et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Les chirurgies sont effectuées sous anesthésie générale et analgésie adéquate, et les animaux maintenus au chaud et surveillés jusqu'au réveil complet. Après réveil et pour les 4 jours suivants, nous effectuerons un suivi de l'état post-opératoire de l'animal. Les animaux bénéficieront d'un suivi clinique rigoureux après leur anesthésie/analgésie. Des points limites prédictifs adaptés ont été déterminés afin d'interrompre les procédures s'ils sont atteints, limitant ainsi la douleur animale à son minimum.

45 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet.

13448 La maladie rénale chronique (MRC) est une maladie grave qui entraîne une détérioration graduelle et irréversible de la capacité des reins à filtrer le sang et à fabriquer certaines hormones. En France comme dans les autres pays occidentaux, 10% de la population souffre de MRC.

En fonction de son stade, la MRC augmente le risque de décès de 2 à 10 fois. La première cause de décès chez les patients atteints de MRC est d'origine cardiovasculaire. En effet, les patients atteints de MRC présentent un risque accru de mort subite due à des troubles du rythme cardiaque. La réduction du taux de mortalité chez les patients atteints de MRC est donc une priorité de santé publique et il est important d'identifier les mécanismes responsables de la surmortalité chez ces patients afin de prévenir ces décès prématurés.

La cause de cette surmortalité d'origine cardiovasculaire au cours de la MRC n'est pas clairement démontrée à l'heure actuelle.

Les données publiées récemment suggèrent fortement qu'une augmentation de la concentration d'une protéine pourrait jouer un rôle pathogène dans les anomalies cardiaques observées chez les patients atteints de MRC. Au-delà de ces études cliniques, des expériences réalisées sur des animaux et sur des cellules cardiaques en culture ont montré que cette protéine induisait une augmentation de la taille du cœur.

Dans des conditions physiologiques, cette protéine peut être clivée en deux fragments: A et B. Des données de notre laboratoire obtenu sur des cellules en culture indiquent que ces fragments peuvent s'opposer aux effets délétères de la protéine intacte en particulier le fragment B pourrait prévenir la survenue d'anomalies à l'origine des troubles du rythme cardiaque et pourrait donc être utilisé pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de diminuer la mortalité cardiovasculaire au cours de la MRC.

Afin de confirmer *in vivo* les propriétés protectrices du fragment B nous souhaitons tester son effet dans un modèle de souris atteintes de MRC.

La première partie de cette étude consistera à induire une MRC chez des souris avec un régime alimentaire spécial pendant 14 jours. Nous utilisons ce régime afin d'éviter l'induction d'une MRC par chirurgie dans un souci du respect bien-être des animaux. La seconde partie du projet consistera à tester l'effet protecteur cardiaque du fragment B chez les souris ayant développé une MRC et chez des souris à fonction rénale normale. A cette fin, nous effectuerons des injections intra péritonéales du fragment B (ou d'eau salée) chez les souris pendant 5 jours. Puis nous caractériserons la fonction cardiaque chez les souris à l'aide d'un capteur du rythme cardiaque implanté sous la peau sous anesthésie.

Ce projet a été conçu dans le respect des 3R consistant à Réduire le nombre d'animaux nécessaires au maximum, à Remplacer si possible les modèles animaux par des modèles non animaux, à Raffiner c'est à dire à respecter le bien-être des animaux utilisés pour le projet.

Les animaux ne peuvent être remplacés par des cellules cardiaques en culture car ces cellules ne conservent pas des caractéristiques stables et ne survivent pas au-delà de 48 heures en culture. Néanmoins, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux utilisés dans la limite statistique raisonnable d'une étude scientifique. En nous basant sur nos données préliminaires et dans un objectif de limiter le nombre d'animaux, nous avons calculé que 74 souris sont nécessaires à la réalisation de notre projet. De plus, de multiples paramètres seront analysés pour chaque souris.

Les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux. Les souris bénéficieront de coton et de maisons en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un nid. La souffrance et l'angoisse seront limitées au maximum par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les souris seront sous surveillance journalière par le personnel de l'animalerie et deux fois par semaine par le responsable du projet avec une évaluation de l'état général de l'animal, du poids, de l'apparence et de son comportement et des points limites ont clairement été établis.

L'avantage de ce projet dans son ensemble sera de nous permettre de comprendre les mécanismes grâce auxquels le fragment B protège le cœur des troubles du rythme au cours de la MRC. L'objectif à terme est de proposer d'utiliser le fragment B pour réduire les événements et la mortalité cardiovasculaires chez les patients atteints de MRC.

13449 La jussie est une plante fréquemment retrouvée, ses feuilles sont très riches en polyphénols avec par conséquent des propriétés anti-oxydantes potentiellement valorisables dans l'alimentation des volailles. Ainsi, nous souhaitons tester l'effet d'une supplémentation de 1% de jussie dans l'aliment des poules reproductrices de type chair sur la croissance et le métabolisme. La période de l'essai expérimental sera de 2 à 5 semaines d'âge soit au total une durée totale de l'essai de 4 semaines. L'effectif total des animaux utilisés dans le protocole sera de 40 (n=20 animaux nourris ad libitum avec un aliment démarrage témoin et 20 animaux nourris dans les mêmes conditions avec ce même aliment témoin supplémenté avec 1% de jussie).

La règle des 3R sera été respectée comme suit :

-Remplacer : Pour évaluer les réponses physiologiques telles que l'évolution du poids, l'engraissement, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté est la poule dans notre protocole.

-Réduire : Des analyses statistiques ont été réalisées afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Ces analyses ont pris en compte les résultats d'un précédent protocole.

-Raffiner : Les poules sont élevées au sol dans des conditions d'élevage classique. Les animaux peuvent se voir. Les enrichissements mis en place sont essentiellement des blocs à piquer et des objets suspendus.

13450 Avec une prévalence d'environ 5 à 8 cas pour 100 000 habitants et par an, les gliomes représentent les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Ils représentent 2000 à 3000 nouveaux cas par an en France et constituent donc une cause importante de souffrance et de mortalité. Leurs traitements reposent, selon leur gravité, sur une exérèse chirurgicale, éventuellement associée à un traitement de chimiothérapie et/ou radiothérapie. Ces tumeurs sont caractérisées par un développement rapide, une forte angiogenèse et une résistance aux thérapies classiques. Il a été décrit dans ces tumeurs une surexpression de récepteurs membranaires, qui induisent un signal favorisant la progression tumorale. Dans le cadre de nos recherches, nous avons identifiées des molécules chimiques qui sont capables de réduire la prolifération de cellules tumorales humaines et d'induire la mort de cellules souches, connues pour être très résistantes aux traitements anti-cancéreux actuels. Ce projet vise à explorer l'intérêt de deux de nos molécules pour le traitement des glioblastomes dans des modèles précliniques chez les souris. Dans un premier temps, nous évaluerons l'activité des molécules dans un modèle de tumeurs sous-cutanées. Après injection de cellules tumorales humaines dans le flanc des animaux et lorsque la taille de la tumeur sera mesurable, nos molécules seront administrées de façon répétées afin d'évaluer leurs effets sur le développement de la tumeur. Dans un deuxième temps nous évaluerons le potentiel thérapeutique de nos molécules dans un modèle de tumeurs cérébrales après injection de cellules tumorales humaines dans le cerveau de souris. Nous évaluerons tout d'abord la capacité de nos molécules à atteindre le cerveau après injection intrapéritonéale en mesurant la quantité de composé dans le cerveau. Enfin, nous évaluerons si l'administration répétée de nos composés diminuent la taille des tumeurs qui sera suivie par imagerie (IRM).

A ce jour, l'animal de laboratoire reste cependant le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant les glioblastomes. En particulier, l'existence de lignées de souris immunodéprimées (nude) qui autorisent la greffe de cellules tumorales humaines permettent la mise en place de tests précliniques.

Ce projet nécessitera 240 souris ; principalement des femelles et sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale : les 3R.

Remplacement: le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'effet thérapeutique doit être évalué sur un organisme vivant entier (tests précliniques).

Raffinement: les animaux sont observés scrupuleusement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. A terme, ces modèles peuvent être associés à des effets néfastes importants : perte de poids sévère, symptômes neurologiques (mouvements anormaux...) ou une immobilité. Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale, et intègre des traitements analgésiques afin de prévenir ou de gérer l'apparition de douleurs. Nous avons mis en place des points limites prédictifs. L'imagerie par IRM est une méthode non invasive pour le suivi des animaux. Réduction: le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. L'utilisation de l'IRM pour le suivi des tumeurs permet aussi de réduire le nombre d'animaux puisque l'intérêt de l'IRM réside dans le fait qu'une même souris peut être observée plusieurs fois dans le temps.

13451 Les espèces Porc, Mouton, Lapin, Rat et Souris permettent l'apprentissage de certaines techniques chirurgicales (anastomoses vasculaires, anastomoses digestives, prise en charge de saignement) ou de certaines techniques d'anesthésies ou d'injections ne pouvant être modélisées *in vitro* pour les étudiants scientifiques et médicaux. De façon complémentaire, des peaux artificielles et des simulateurs de chirurgie sont déjà utilisés pour le remplacement et pour permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Afin de permettre ces différentes formations, nous aurons besoin de 30 moutons, 150 souris, 700 rats, 100 porcs et 20 lapins par an.

Les animaux seront hébergés dans une animalerie conventionnelle avec des conditions environnementales favorables à leur bien-être: température, cycle jour/nuit 12h/12h, enrichissement adapté, permettant d'exprimer une gamme de comportement naturelle nécessaire au bien-être animal.

Nous serons particulièrement attentifs à réduire les animaux en les réutilisant et en prenant en charge leur douleur de façon optimisée d'une formation à l'autre (Raffiner).

Ces derniers permettront de former plus de 400 personnes par an aux différentes techniques.

13452 Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Ce contact avec l'organisme pouvant être prolongé dans le temps (par exemple, lors de l'implantation d'un dispositif médical), des réactions cliniques indésirables liées à une toxicité systémique ou locale sont susceptibles de se manifester.

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

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

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

et chainette + baton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

13453 Au cours de la vie et avec le vieillissement de la population, des lésions surviennent généralement sur une matrice saine dans un contexte de traumatisme, d'activités sportives (entorse grave, rupture du ligament croisé antérieur ou encore après luxation rotulienne), de dégénérescence chronique (surcharge mécanique) ou d'anomalies de l'os sous-chondral (nécrose, ostéochondrite). Ces lésions conduisent à une usure progressive de l'articulation. Le tissu de réparation obtenu ne possède pas les caractéristiques biomécaniques et biochimiques du cartilage natif, prompt à une dégradation à court terme. Ces lésions focales concourent à l'établissement d'une arthrose plus ou moins rapidement. Actuellement aucune thérapie utilisée en pratique clinique ne permet la régénération d'un tissu cartilagineux originel.

L'objectif de ce projet est d'étudier la bio-fonctionnalité et la bio-intégration d'un substitut cartilagineux obtenu par impression 3D après greffe en site articulaire chez le rat. Ce greffon a été conçu *in vitro* par ingénierie tissulaire à partir d'une bio-encre à base d'alginate et de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues de moelle osseuse humaine. Des études précédentes de greffe sous-cutanée de ces substituts chez la souris nude n'ont montré aucune réaction inflammatoire et les biomatériaux ont pu être récupérés pour analyse après 1 mois, 2 mois et 3 mois après greffe.

Le modèle de greffe ostéochondrale sera réalisé chez le rat immunodéprimé afin d'éviter le rejet du substitut produit à partir de cellules humaines. Il consistera en un forage calibré au sein du cartilage du condyle médial du genou droit. Le genou controlatéral servira de témoin.

Pour cela, 54 rats immunodéprimés (athymiques) séparés en trois groupes:

Groupe 1: sur le genou droit, nous procéderons à une ouverture chirurgicale de l'articulation suivie d'un forage calibré au sein du condyle médial sans greffe de substituts cartilagineux générant ainsi un tissu de réparation spontanée (groupe témoin) (18 rats).

Groupe 2: sur le genou droit, nous procéderons à une ouverture chirurgicale de l'articulation suivie d'un forage calibré au sein du condyle médial et d'une greffe d'un substitut fonctionnalisé avec des CSMs issues de moelle osseuse cultivées pendant 56 jours dans des conditions de culture optimisées et dans un environnement normalement oxygéné (18 rats).

Groupe 3: sur le genou droit, nous procéderons à une ouverture chirurgicale de l'articulation au sein du condyle médial et d'une greffe d'un substitut fonctionnalisé avec des CSMs issues de moelle osseuse cultivées pendant 56 jours dans les conditions de culture optimisées et dans un environnement normalement oxygéné (18 rats).

Les rats seront ensuite mis à mort après 1 mois, 2 et 3 mois après la greffe articulaire et les genoux seront récupérés pour effectuer des analyses histologiques et immunohistochimiques. 6 animaux par groupe seront nécessaires (3 conditions et 3 temps d'étude, soit 54 animaux). Nous pourrions ainsi apprécier la biodégradabilité de l'implant, sa bio-fonctionnalité et sa bio-intégration au sein du cartilage et son devenir. Pour évaluer ces différents paramètres, nous procéderons à une évaluation de la qualité du tissu de réparation à l'échelle macroscopique et microscopique.

Les lésions ostéochondrales et la greffe ne sont pas invalidantes pour l'animal et ne peuvent pas conduire à la mort de l'animal. Dans notre pratique, les rats ne boitent plus dès le lendemain de l'intervention, ce qui justifie une antalgie peropératoire et pendant les 24 heures suivantes par buprénorphine (0,05 mg/kg). Cependant, nous surveillerons quotidiennement les animaux et ceux qui présenteront des anomalies du comportement (vocalise, cachexie) et/ou une perte de poids supérieure à 20% (sur une semaine sans reprise de poids) seront mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. L'apparition d'une infection articulaire (tuméfaction de l'articulation et boiterie) consécutive à l'intervention (en pratique quasi nulle) nous obligera aussi à mettre à mort l'animal.

Ce modèle animal est indispensable pour connaître la bio-fonctionnalité, la bio-intégration et le devenir de la greffe cartilagineuse dans le cadre de la thérapie des lésions focales du cartilage. Enfin, dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum et est nécessaire et suffisant pour les études statistiques. De plus, seul le côté droit sera opéré de façon à conserver le genou gauche comme témoin (Réduction). Ce modèle de greffe de cartilage chez le rat athymique est un modèle connu et maîtrisé par notre laboratoire (Raffinement). Tous les animaux seront mis à mort selon la méthode réglementaire. Les genoux seront prélevés de façon à effectuer les études macroscopiques, histologiques et immunohistologiques pour évaluer la gravité des lésions en fonction des groupes.

13454 Le but de cette étude est d'affiner les paramètres (doses, fréquences d'administration) d'un traitement pour l'achondroplasie, qui est la forme de nanisme la plus fréquente. Ceci se place dans la continuité d'un projet précédent. Cette maladie est due à une modification dans un gène qui résulte en l'arrêt de la croissance osseuse. L'achondroplasie est une maladie génétique rare qui entraîne un retard de croissance, associé à de nombreuses complications parfois sévères, comme cyphose thoraco-lombaire et macrocéphalie avec bosse frontale et hypoplasie de la partie moyenne du visage. Il a été montré dans une étude précédente que nous avons trouvé un traitement potentiel pour cette forme de nanisme.

Nous avons des souris qui présentent la même maladie que les patients. Nous utilisons dans ce PEA une souche à phénotype dommageable (troubles de la locomotion, paralysie unilatérale, paralysie bilatérale avec atteinte de la vessie, troubles respiratoires). Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux afin de mettre en place un potentiel traitement chez l'Homme. Les projets précédents nous ont permis de choisir la molécule de référence qui a démontré son efficacité sur la croissance de souris nouveau-nées. Ce projet a aussi comme objectif de tester plusieurs candidats optimisés de la molécule de référence pour continuer le développement pharmacologique de la meilleure molécule. Les résultats de ce projet nous permettront de transposer l'utilisation de ce traitement de façon plus adéquate chez l'enfant.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie. Ce potentiel traitement permettrait de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications, notamment les paralysies de la moelle épinière.

Afin de satisfaire avec les exigences de la règle des 3R, nous avons déjà mis en place différentes stratégies. Tout d'abord dans un but de remplacement nous avons choisi les molécules optimisées après avoir réalisé des expériences sur cellules afin de ne tester chez l'animal que les molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé. Dans un but de réduction nous avons estimé le nombre d'animaux strictement nécessaire fondé sur un calcul de puissance statistique et basé sur notre expérience des résultats précédents. Enfin dans un but de raffinement des expériences nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux au cours des procédures grâce à des grilles de suivi et l'établissement de points limites précoces. Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (igloos, briques de bois à grignoter, buchettes, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée.

Pour ce projet de 5 ans, nous estimons que nous allons utiliser au maximum 5470 souris soit 1260 souris dans la procédure 1, 2000 souris dans la procédure 2, 1700 souris dans la procédure 3, et 510 souris dans la procédure 4.

13455 Il est maintenant bien établi que des lipides des membranes cellulaires appelés sphingolipides (SLs), peuvent réguler des phénomènes essentiels tels que la croissance, la différenciation, la

survie ou la mort cellulaire, mais aussi l'angiogenèse, le trafic lymphocytaire et la réponse immunitaire.

Notre projet a pour objectif général de clarifier le rôle de certains SLs simples dans des événements clés de la progression du mélanome: prolifération, résistance aux traitements anticancéreux, migration et dissémination et la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans ce contexte, nous souhaitons aussi clarifier le rôle de la signalisation de récepteurs de mort cellulaire qui module non seulement la progression du mélanome et la réponse immunitaire antimélanome mais aussi le métabolisme sphingolipidique.

Ainsi, nos travaux visent à comprendre comment ces lipides et les récepteurs de mort cellulaire agissent pour favoriser ou freiner le développement du mélanome, et à proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient améliorer les résultats des traitements actuels. L'étude des sphingolipides et de la signalisation des récepteurs de mort cellulaire nécessite l'utilisation de cellules et d'animaux génétiquement modifiés pour les enzymes de ce métabolisme.

De plus, les modèles murins de cancer utilisés dans cette étude sont les seuls modèles disponibles aujourd'hui qui reproduisent les signes cliniques et histologiques de cancer observés chez l'Homme. Il n'existe pas d'autres méthodes alternatives pour analyser le rôle des SLs et des récepteurs de mort cellulaire dans la progression du mélanome et sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Nous utiliserons des souris C56BL/6 sauvages ou génétiquement modifiées permettant le développement de tumeurs à partir de cellules murines transformées ou cancéreuses, et des souris immunodéficientes permettant le développement de tumeurs à partir de cellules d'origine humaine portant ou non des modifications génétiques.

- sexe : mâles et femelles

- âge : 6-16 semaines

- poids : 20-30g

- nombre de souris sur 5 ans environ 4320 souris: Nombre de 6 animaux par condition expérimentale (suffisamment élevé pour études statistiques) 4 à 6 conditions par expériences (+/- traités par injection d'anticorps monoclonaux, +/- inhibiteurs pharmacologiques, +/- cellules cancéreuses génétiquement modifiées), 2 expériences indépendantes, tous les mois pendant 5 ans.

L'observation par les expérimentateurs et/ou le personnel zootechnique sera réalisée quotidiennement. La mesure du volume tumoral se fera tous les 2 à 3 jours, puis quotidiennement en fin de protocole. Des points limites adaptés seront mis en place.

Pour réduire, éviter et atténuer toute forme de souffrance des animaux, un contrôle quotidien sera effectué et un enrichissement du milieu (igloos, sizzlenest pour la nidification, morceaux de bois à grignoter) pourra être envisagé. L'enrichissement sera adapté en fonction du comportement des animaux observés et il pourra être complété par l'anesthésie des animaux au cours de la procédure.

13456 La maladie de Marek (MD) est associée à un lymphome T, un cancer mortel chez la poule. Cette maladie hautement contagieuse est due à un alphaherpesvirus, le virus de la maladie de Marek (MDV). Les vaccins utilisés contre la MD depuis les années 1970, (par exemple l'herpèsvirus du dindon, HVT) sont imparfaits. En effet, s'ils préviennent bien la formation des tumeurs, ils n'empêchent pas la réplication des virus pathogènes, qui restent très présents dans les élevages à l'échelle mondiale.

Le cycle de vie du MDV chez la poule a été proposé par B. Calnek en 2001, résultant de multiples études chez l'animal. Ce modèle présente encore certaines boîtes noires que les outils modernes à notre disposition peuvent éclairer. Le cycle de vie du virus vaccinal HVT a été très peu étudié et sa connaissance permettra d'ouvrir des pistes d'amélioration de l'efficacité de ce vaccin dans la maîtrise de l'infection MDV.

Le but de ce projet est de mieux caractériser l'infection précoce par le MDV et le virus vaccinal HVT ainsi que les étapes précoces de la tumorigénèse induite par MDV. Pour cela, nous utiliserons des virus recombinants MDV ou HVT équipés de systèmes rapporteurs adaptés à l'imagerie *in vivo* sur

animal vivant (protéines bioluminescentes et/ou fluorescentes). Après infection, les animaux seront imagés plusieurs fois au cours du temps de façon à suivre la distribution spatio-temporelle de l'infection virale ou des tumeurs.

Les infections expérimentales seront menées sur des poussins de 1 à 5 jours (ou sur des embryons de 18 jours pour l'expérience 5) et les analyses se dérouleront dans les 2 à 4 semaines suivant l'infection, avant l'apparition des signes cliniques de la maladie.

Le projet nécessitera au maximum 130 animaux. La règle des « 3R » sera appliquée ainsi :

- Remplacement : Il n'existe à ce jour aucune méthode *in vitro* pour appréhender la dissémination entre organes, le développement des tumeurs dans le contexte d'une réponse immunitaire ou la transmission entre animaux, et donc de remplacer l'expérimentation *in vivo*.

- Réduction : Un même animal sera imagé plusieurs fois au cours du temps afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. C'est un des atouts majeurs de ces appareils d'imagerie *in vivo*.

- Raffinement : Afin d'assurer le bien-être des animaux, les expériences se dérouleront avant la phase clinique de la maladie de Marek pour les lots inoculés par le MDV. Les poussins seront observés tous les jours afin de repérer d'éventuels signes cliniques de la MD. De plus, leur milieu de vie sera enrichi (jouets suspendus). Toutes les procédures expérimentales seront effectuées par du personnel très expérimenté à la préhension, à la contention et à l'inoculation de pathogènes ou de substrat afin de réduire la durée de manipulation et le stress des animaux. Le matériel pour les inoculations sera adapté à la taille des animaux et à la voie d'inoculation afin de générer des douleurs classées comme légère. Pour chaque procédure d'imagerie, les animaux seront anesthésiés par anesthésie gazeuse et une attention particulière sera faite au bon réveil des animaux. Pendant l'imagerie, les animaux seront placés sur une plaque chauffante à 37°C, afin d'assurer leur confort thermique.

13457 Dans nos sociétés modernes où l'espérance de vie ne cesse d'augmenter, la presbyacousie ou la perte de l'audition liée à l'âge constitue un problème de santé publique majeur. La presbyacousie est une pathologie multifactorielle faisant intervenir une combinaison de facteurs individuels (âge, génétique) et environnementaux (exposition au bruit, prise de médicaments). A ce jour, les mécanismes responsables de la presbyacousie sont mal connus et il n'existe pas de thérapie pour ralentir ou stopper la presbyacousie.

Notre objectif est donc de développer et de mettre en œuvre des stratégies thérapeutiques expérimentales *in vivo* capables de ralentir, voire stopper l'apparition des pertes auditives liées à l'âge. Pour cela, nous avons déposé une demande d'autorisation de projet pour étudier l'efficacité thérapeutique potentielle de certains outils pharmacologiques et géniques sur la cochlée (organe périphérique de l'audition) de plusieurs modèles murins bien identifiés de presbyacousie : la lignée SAMP8 (Senescence accelerated prone 8 mouse) et la lignée transgénique OPA1 (Optical Atrophy Dominant) et la lignée de souris p43.

La protéine p43, un récepteur alpha aux hormones thyroïdiennes localisé au niveau mitochondrial. Les mitochondries étant des organites cellulaires fournissent la plus grande partie de l'énergie nécessaire à l'activité cellulaire ; l'absence de la protéine P43 a pour conséquences un dysfonctionnement mitochondrial à l'origine du stress oxydant dans le muscle et le foie chez les souris (p43 -/- chez qui on a supprimé la protéine p43). Les souris p43 -/- présentent aussi une perte prématurée de l'audition durant le vieillissement.

Dans cet avenant pour être au plus proche des pathologies humaines, nous souhaitons comparer nos résultats obtenus chez les souris p43 -/- avec ceux des souris THRA-CR1 portant une mutation humaine sur le gène codant les récepteur alpha aux hormones thyroïdiennes. Les résultats obtenus dans ce projet nous renseigneront donc sur les conséquences de la délétion ou de la mutation de ce gène sur l'audition.

Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation et de les remplacer par des modèles de substitutions, nous avons déjà étudié des mécanismes responsables des pathologies de l'oreille interne en absence de la protéine p43 sur des cochlées (organe de l'audition) en culture *in vitro*. Ces études nous ont permis de montrer que l'absence de la protéine p43 entraîne une dysfonction

mitochondriale et du stress oxydant dans la cochlée, qui seraient responsables de la dégénérescence des cellules de l'oreille interne. Ces modèles *in vitro* nous ont également permis de cribler quelques molécules candidates. Maintenant, nous devons confirmer ces résultats *in vitro* sur des modèles *in vivo* plus proches des pathologies humaines. Pour ce faire, nous utiliserons des souris P43/- et des souris THRA-CR1 âgées de 1, 6 et 12 mois. Notre objectif final est de développer des traitements adaptés.

Pour réaliser l'ensemble des expérimentations proposées dans cette saisie, nous aurons besoin de 90 souris au total dont 9 souris témoins contrôles de souche C57BL/6J, 57 souris P43/- et 24 souris THRA-CR1.

Cette étude sera menée en conformité avec les recommandations de la règle des 3R. Nous veillerons notamment à :

- utiliser un nombre minimum et suffisant d'animaux
- héberger les souris dans un environnement enrichi
- anesthésier les animaux pour les interventions chirurgicales et les tests fonctionnels
- suivre assidûment les animaux en cours d'expérimentation
- appliquer des points limites en cas de gêne ou souffrance manifestées.

13458 Le projet a pour but d'explorer la voie de la prostacycline, voie impliquée, en outre, dans le phénomène de vasodilatation et de cicatrisation cutanée. De plus, notre hypothèse est que celle-ci est altérée dans le cas de pathologie diabétique (présentant une atteinte au niveau microcirculatoire cutanée et un retard de cicatrisation). En effet une hyperglycémie chronique induit des altérations structurales et fonctionnelles à l'origine d'une des complications bien connues du diabétique : l'ulcère diabétique.

Cette complication en fait la première cause d'amputation non traumatique des membres inférieurs. Nous évaluerons l'efficacité de l'administration par iontophorèse d'une molécule favorisant la cicatrisation (analogue de la prostacycline). La compréhension de la voie de la PGI₂ est donc essentielle dans une optique thérapeutique et s'inscrit dans la continuité du développement d'un médicament.

La voie de la PGI₂ est une cascade de réaction avec plusieurs acteurs qui débute par l'activation des senso-neuronnes de la peau et qui débouche à une vasodilatation en passant par la production, en outre, de prostacycline à partir d'acide arachidonique. Afin d'activer cette voie on utilise donc un courant électrique de quelques μA que l'on administre sur la peau. Cette évaluation de la voie de la prostacycline sera complétée par un suivi des paramètres électriques de la peau en cours de cicatrisation.

Nous avons choisi de travailler sur la souris car la cicatrisation est un phénomène complexe utilisant beaucoup d'acteurs différents qui rendent impossible sa reproduction fidèle *in vitro* ou *in silico*. La mise au point du protocole de mesure des paramètres électriques sera réalisée sur un modèle de rat sain qui permet de tester simultanément plusieurs protocoles de mesure. L'effectif des animaux utilisés soit 400 animaux dont 360 souris et 40 rats, a été calculé en fonction de la puissance des tests statistiques prévus et des résultats intermédiaires attendus. Le suivi régulier des animaux sera réalisé pour s'assurer de leur bien-être. Nous utiliserons un tapis chauffant pendant les anesthésies ainsi que du lacrigel afin d'éviter des lésions oculaires dues aux anesthésies gazeuses répétées. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée au comportement de l'animal sera utilisée et des analgésiques sont prévus pour soulager la souffrance (Buprénorphine en sous-cutané pour les chirurgies puis doliprane dans l'eau de boisson).

13459 Le système endocannabinoïde (EC) est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire, du métabolisme énergétique et participe au développement de l'obésité et du diabète de type 2. Le fait qu'il soit suractivé au cours de l'obésité et que les EC soient capables de moduler la sensibilité à l'insuline des tissus et leur capacité à produire de l'énergie (captation de glucose, biogenèse mitochondriale) suggère un rôle potentiel du système endocannabinoïde dans le contrôle de

l'homéostasie protéique, en particulier au niveau musculaire. Des résultats préliminaires obtenus montrent que certains antagonistes de ce système stimulent la synthèse protéique dans un modèle de cellules musculaires *in vitro*.

La sarcopénie se définit comme la perte involontaire de masse, force et fonction musculaire associée au vieillissement. Sa physiopathologie est complexe et résulte de la combinaison de l'altération de différents facteurs : augmentation de la dégradation protéique, diminution de la synthèse protéique, diminution de l'activité mitochondriale musculaire et résistance aux stimuli anaboliques incluant insuline et acides aminés. La résistance aux stimuli anaboliques observée avec l'âge est encore mal comprise mais pourrait résulter d'une infiltration lipidique musculaire accrue ou d'altérations mitochondriales. Ce type d'atteintes est également couramment observé au cours de l'obésité, et cette dernière accroît la fonte musculaire au cours du vieillissement. On parle alors d'obésité sarcopénique. Dans ce contexte, le système endocannabinoïde a un rôle majeur potentiel puisqu'il contrôle le développement de l'obésité, de l'insulinorésistance et l'activité mitochondriale.

Le rôle de ce système dans le contrôle de l'anabolisme musculaire et ses altérations éventuelles au cours du vieillissement n'ont à ce jour pas été caractérisés. L'objectif de cette étude sera d'étudier les liens potentiels entre système endocannabinoïde et anabolisme musculaire (principalement la synthèse protéique) dans le cadre d'une obésité induite chez des souris âgées. Pour cela, des souris âgées seront soumises soit à un régime contrôle soit à un régime riche en graisses et en sucre (HFD) pendant 25 semaines. Une partie des souris nourries avec le régime HFD sera traitée durant les 6 dernières semaines de régime avec un antagoniste du système EC pour l'inhiber (HFD+antagoniste). Puisque l'antagoniste utilisé est connu pour modifier la prise alimentaire, un groupe de souris HFD pair-fed sera utilisé ; ce groupe recevant l'apport alimentaire journalier mesuré dans le groupe HFD+antagoniste. Nous utiliserons également un groupe de souris adultes pour nous permettre de quantifier le degré de sarcopénie de nos souris à la fin des régimes et traitement. A la fin de ce régime, 24 animaux par groupes seront abattus : 12 animaux à jeun et 12 animaux en période post-prandiale. Nous comparerons les mesures effectuées durant les phases pré- et post-prandiales, puisque de nombreux travaux démontrent que la synthèse protéique musculaire est principalement altérée en phase post-prandiale, et proviendrait d'un défaut de réponse à l'action anabolique des nutriments et hormones associés à la prise alimentaire.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro* ou *ex vivo* mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance. Pour répondre aux objectifs de cette étude nous utiliserons 120 souris réparties en 5 groupes expérimentaux.

13460 La communauté scientifique utilise la souris comme modèle animal pour faire progresser la recherche biologique et médicale.

Notre laboratoire propose différentes prestations permettant la conservation de lignées murines. Ces précieux modèles correspondent à des lignées génétiques qui ne sont pas disponibles dans les établissements fournisseurs d'animaux de laboratoire.

La conservation des lignées se fait sous forme d'embryons et de sperme congelés dans l'azote liquide à -196°C. Elle permet :

- d'éviter le maintien inutile sous forme respirant des lignées quand le chercheur a fini son étude.
- de redémarrer à tout moment un élevage si besoin.
- de bénéficier de modèles animaux déjà existants pour l'ensemble de la communauté scientifique.

Nous estimons faire 120 prestations par an. Le nombre de souris utilisées est proportionnel au nombre de lignées congelées. Notre objectif est d'effectuer davantage de congélations de sperme que de congélations d'embryons ; Ainsi, en réduisant le nombre de prestations de congélation

d'embryons au profit de la congélation de sperme, nous allons réduire de façon très significative le nombre total d'animaux utilisés.

Pour l'ensemble des 600 prestations effectuées par le service cryoconservation en 5 ans, nous estimons la quantité totale d'animaux utilisés à 20 050 souris maximum. Ce nombre prend en compte les animaux utilisés pour réaliser les tests de viabilité de chaque prestation.

Ce projet est totalement en adéquation avec la règle des 3R=

-REDUIRE :

Les mâles vasectomisés sont utilisés pour plusieurs séries d'accouplement ce qui permet de réduire leurs nombres.

Grace à la maîtrise de la microchirurgie, le nombre de femelles anesthésiés/ réimplantés est réduit au maximum : pour chaque lignée, 2 femelles sont souvent suffisantes : c'est la qualité des embryons qui nous oblige de temps en temps à effectuer de nouvelles réimplantations.

Pour la congélation de sperme, un nouveau milieu de superovulation nous permet de diviser par 2 le nombre de femelles utilisées lors des tests de fertilités.

Pour terminer, pour la congélation d'embryons : l'utilisation de femelles prepubères et une superovulation de ses dernières avant la mise en accouplement permet d'augmenter de manière significative le nombre d'embryons par femelle et donc de réduire leurs utilisations.

-RAFFINER :

Pour l'ensemble de nos microchirurgies, nous attachons beaucoup d'importance au bien-être des animaux pendant et après l'opération :

-Une injection d'anesthésique (kétamine, xylazine) en intra-péritonéale permet d'endormir les animaux et à empêcher toute sensation de douleur.

-De l'ocry-gel est administré sur les yeux des souris pour éviter un assèchement de la cornée.

-Un tapis chauffant réglé à 37°C est installé sous l'animal pendant l'opération afin d'éviter toute sensation de froid.

Autant que possible les animaux sont hébergés en groupe sociaux ; ils ont aussi des enrichissements de milieux mis à disposition.

Nous avons prévu des points limites adaptés et prédictifs en cas de signes de douleurs.

-REEMPLACER :

L'objectif de ce projet étant la production d'embryons ou de sperme il est donc impossible de remplacer les animaux. Mais lorsqu'une de nos prestations est terminée, dans la majorité des cas cela permet de ne pas conserver sous forme respirantes la lignée et évite donc l'utilisation d'animaux en quantité importante. Sur l'ensemble de ce projet ; aucune souffrance n'a été observé à ce jour ; On peut dire que ce qui a déjà été mis en place pour éviter toute souffrance chez les animaux (anesthésique,ocry-gel, tapis chauffant) suffit.

13461 Les solvants organiques sont ubiquitaires dans le monde du travail. Une fois dans l'organisme, ils franchissent aisément la barrière hémato-encéphalique et atteignent rapidement le système nerveux central. Les symptômes neuronaux d'une exposition aiguë sont des maux de tête, nausée, difficulté de concentration, vertiges, fatigue etc. Ces effets sont réversibles et disparaissent avec l'arrêt de l'exposition. Au niveau moléculaire, de nombreux solvants sont connus pour perturber la transmission nerveuse. Ces modifications de l'activité cérébrale sont mesurables *in vivo* par électroencéphalographie. En expérimentation animale, cette méthode quantitative a comme avantage la mesure en temps réel de l'activité cérébrale pendant l'exposition tout en laissant l'animal libre de ses mouvements. Chez l'animal, la méthode est nommée électrocorticographie (ECoG) car l'activité électrique corticale est mesurée grâce à des électrodes placées sur le cortex et non sur le scalp comme chez l'Homme. Ce projet s'articule autour de 8 procédures et nécessitera 244 animaux au total. Les expérimentations seront réalisées sur des rattes adultes Long-Evans acclimatées en cycle inversé afin de mesurer l'activité cérébrale pendant leur phase de réveil (phase nocturne). Les rattes seront exposées corps entier par inhalation dans des chambres à atmosphère

contrôlée pendant 8 heures par jour, 4 jours consécutifs. Les solvants testés sont le styrène, le toluène et la méthyl-éthyl-cétone (MEK). L'exposition au toluène servira d'étude pilote (n = 16) pour valider nos paramètres de mesure et de calculs des signaux ECoG, tandis que la sensibilité et la spécificité de l'ECoG seront étudiées avec l'inhalation de styrène (n = 104) ou de MEK (n = 104). Des rats surnuméraires (n = 20) sont prévus pour remplacer les animaux qui ne seraient pas admissibles pour le projet (otites, mort à la chirurgie, casques défectueux...). La sensibilité de la méthode ECoG sera évaluée par comparaison des résultats obtenus avec l'ECoG avec les résultats de tests comportementaux et neurosensoriels. Les groupes d'animaux dédiés à ces tests (n = 64) passeront les tests en sortie du quatrième jour d'exposition. La spécificité de l'ECoG sera quant à elle évaluée en comparant les seuils d'apparition d'effets entre le styrène et la MEK avec trois concentrations croissantes de solvants. Ce projet intègre une démarche de réduction du nombre d'animaux, de raffinement et de prise en charge de la douleur. Pour cela, les expositions au styrène et à la MEK se feront en deux temps : tout d'abord une exposition à 1000 ppm de solvant 4 jours consécutifs permettant de comparer les effets en ECoG avec les effets des tests comportementaux et neurosensoriels. Des résultats de cette exposition dépendront les trois concentrations de solvant pour la série d'expositions avec des concentrations croissantes qui sera effectuée dans un deuxième temps. Cette série d'expositions sera réalisée sur un même groupe d'animaux afin de déterminer les seuils d'apparition d'effets. Des dosages cérébraux et sanguins de solvant seront effectués au terme de la semaine de récupération afin de s'assurer d'un retour à un seuil non détectable de solvant avant d'exposer de nouveau les animaux. Ce projet tient également compte de la souffrance de l'animal et des actions seront menées afin de la réduire. Ainsi, les rattes impliquées dans la procédure de chirurgie recevront une injection de morphiniques quinze minutes avant la chirurgie. La pose de casques céphaliques se faisant sous isoflurane, un anti-inflammatoire non stéroïdien d'action 12h sera injecté en post-opératoire. Au besoin, cette injection sera renouvelée le lendemain de la chirurgie. La dose nécessaire de ce médicament sera déterminée lors de l'étude pilote. En plus des antidouleurs, d'autres dispositions seront prises pour faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau en plaçant de la nourriture et de l'eau gélifiée dans la cage. De plus, un gel ophtalmique sera appliqué sur les yeux de l'animal pendant l'anesthésie. Pour diminuer le stress inhérent à nos procédures et tests, des protocoles d'habituation seront mis en place en plus d'une manipulation quotidienne. Ces protocoles débiteront une semaine après la chirurgie et deux semaines avant les expérimentations. Par ailleurs, les oscillations cérébrales étant bien conservées entre les rongeurs et l'Homme, les perturbations observées chez le rat seront transposables à l'Homme. Nos résultats seront donc pertinents pour évaluer la perturbation de l'activité cérébrale par des molécules volatiles chez les salariés travaillant dans des atmosphères polluées.

13462 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie cardio-pulmonaire sévère. Elle est caractérisée par une augmentation anormale de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-dessus de 20 mmHg au repos. L'HTAP est caractérisé par une obstruction des artères pulmonaires de petit calibre (diamètre inférieur à 500 μ m) conduisant à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. Cette élévation de la PAP aboutie à une hypertrophie cardiaque droite puis à une insuffisance cardiaque et à terme au décès du patient.

Les mutations dans le gène *BMPR2* constituent le premier facteur de risque génétique de la maladie. Les malades HTAP qui en sont porteurs développent la maladie plus tôt, présentent une adaptation cardiaque plus faible à l'augmentation de la PAPm et meurent plus tôt de défaillance cardiaque droite. Cependant, seulement 20 % des porteurs de la mutation développent un HTAP sans que l'on sache quel est le facteur déclenchant. Nous avons des résultats similaires chez les rats porteurs de mutation *Bmpr2*.

Les patients deviennent symptomatiques (essoufflement à l'effort) et ne sont diagnostiqués que dans les stades terminaux de la maladie. Il n'est donc pas possible de disséquer l'histoire naturelle du développement de la maladie chez l'homme. C'est pour cette raison que nous travaillerons avec un modèle animal de cette maladie héréditaire. Le rat nous permettra ainsi d'avoir accès aux stades qui précèdent la maladie.

Pourtant, comprendre comment se met en place l'augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires et les mécanismes sous-jacents est un enjeu majeur pour ralentir la progression de la maladie et augmenter la survie des malades.

Pour comprendre comment se met en place ce remodelage et identifier un biomarqueur prédictif du développement de l'HTAP dans le contexte de mutation *BMPR2*, nous allons réaliser une étude métabolomique en cinétique sur le plasma des rats porteurs de mutation *Bmpr2* en comparaison aux animaux sauvages.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées au cours du temps par des méthodes non invasives comme l'échocardiographie, permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation après un dernier bilan (cathétérisme) de leur fonction cardiaque, et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter autant que possible le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 110 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. L'utilisation d'animaux représente la seule alternative dont nous disposons pour comprendre comment se met en place dans le temps, le remodelage vasculaire pulmonaire responsable de l'HTAP et identifier un biomarqueur prédictif du développement de cette maladie dans le contexte de mutation *BMPR2*. Le remplacement n'est donc pas possible dans ce cadre d'étude.

Au vu de l'absence de biomarqueur permettant de prédire l'occurrence de l'HTAP associée à une mutation dans le gène *BMPR2*, ce projet présente une utilité majeure dans la prise en charge de ces malades.

13463 Parmi les protéines impliquées dans la perception et la transmission de la douleur, une protéine G (GPR30), activée suite à l'activation du récepteur aux estrogènes $ER\alpha$, semble représenter une nouvelle cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de la douleur.

Cette étude s'intéresse à l'action d'un peptide dérivé du récepteur $ER\alpha$ à l'œstradiol. Ce peptide, le $ER\alpha 17p$, ne contient que la région charnière du récepteur $ER\alpha$ (contenant les 3 sites de signal de translocation nucléaire et des sites cibles pour les enzymes protéolytiques). Il a été créé dans le but de mieux caractériser l'implication physiopathologique de cette région protéique.

En 2015, il a été démontré *in vitro* (cellule ELT3) que ce peptide (tout comme le récepteur $ER\alpha$), entraîne une activation rapide de cascades intracellulaires impliquant un récepteur aux protéines G (GPR30), l'EGFR et la CaM et aboutissant à la phosphorylation de ERK1/2 et ainsi la prolifération cellulaire.

Le but de ce projet est 1) d'évaluer un possible effet antalgique du peptide ; 2) de confirmer que l'effet est médié par GPR30 et 3) de localiser l'action antalgique du peptide.

Cette étude sera réalisée chez des souris mâles et femelles âgés de 8 semaines. Le nombre total d'animaux utilisés sur une période de 3 ans est estimé à environ 600, ce dernier est justifié dans le dossier technique et répond à la fois à la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement) et aux contraintes statistiques prenant en compte la variabilité des paramètres étudiés. Les animaux seront surveillés quotidiennement, si un animal présente une trop forte douleur (mesurée expérimentalement), un comportement stéréotypé ou anormal ou une posture anormale ou une réduction de poids de 20%, celui-ci sera euthanasié par le personnel de l'unité de stabulation animale. Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » autant que possible. Le remplacement ne peut ici s'effectuer puisque la douleur ne peut être appréciée que dans un modèle vivant intégré. Le raffinement est ici réalisé par une méthodologie stricte nécessaire pour des expériences de comportement : travail en blocs, expérimentateur identique pour une expérience

donnée, travail en aveugle, manipulation réalisée dans un contexte calme, etc... La réduction maximale du nombre d'animaux est réalisée par une étude bibliographique afin d'éviter toutes manipulations répétitives, par une méthodologie rigoureuse permettant des données très homogènes, un calcul statistique préliminaire du nombre d'animaux. De plus, les expérimentations seront réalisées séquentiellement sous forme d'arbre décisionnel. Par exemple, si une expérimentation est négative alors les autres expérimentations envisagées ne seront pas réalisées.

13464 Nous souhaitons identifier des gènes qui contrôlent l'initiation et la résolution de la réponse inflammatoire dans les articulations arthritiques. La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique qui affecte principalement les articulations et où les macrophages (M ϕ) contribuent directement à l'inflammation et à l'érosion osseuse. Les M ϕ sont des cellules immunitaires présentes dans tous les tissus de l'organisme jouant un rôle clé dans l'intégrité des organes. Contrairement aux M ϕ d'autres tissus, la diversité des M ϕ articulaires reste inexplorée. Notre objectif est de déterminer l'origine des M ϕ résidents du tissu articulaire en conditions normale et au cours de l'arthrite.

Ce projet sera réalisé chez la souris car nous disposons de modèles animaux adaptés pour suivre les cellules d'intérêt *in vivo*. Nous utiliserons au maximum 234 souris dans ce projet, réparties en différentes expériences et groupes.

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

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé en tenant compte des pertes éventuelles lors des interventions chirurgicales et en se basant sur l'expérience acquise au laboratoire en termes d'incidence de l'arthrite chez la souris et de mise en évidence d'effet significatif de paramètres mesurés en fin d'expériences, renseignant sur la structure du tissu articulaire et sa composition cellulaire.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Les interventions chirurgicales se feront sous anesthésie kétamine/xylazine et de la buprénorphine sera administrée aux animaux en post-opératoire. Des gels de nourriture hydratée seront placés dans la litière afin de faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

- Remplacement : l'étude de l'origine et du rôle des M ϕ de l'articulation normale et arthritique ne peut se faire que sur animaux vivants. Il n'est donc pas possible de prévoir une méthode substitutive pour répondre à la question scientifique de ce projet.

13465 Les douleurs chroniques touchent 10% de la population mondiale, mais l'absence de traitement efficace entraîne à terme le développement de comorbidités (dépression, troubles du sommeil, addiction aux opioïdes...) qui renforcent la marginalisation et la diminution drastique de la qualité de vie des patients. Au niveau cellulaire, il a été montré que cet état s'accompagne d'une activation du système immunitaire dans le cerveau et de la synthèse d'une nouvelle protéine dans ces cellules. Ce projet vise à étudier précisément le rôle de cette protéine dans les comorbidités observées lors d'une douleur neuropathique chez la souris et à déterminer si l'inactivation de son gène enlève ces comorbidités. Une analyse de l'activation du système immunitaire sera également effectuée. Le nombre d'animaux sera limité au maximum (en utilisant les mêmes animaux pour l'analyse du comportement et les études biochimiques), en enrichissant le milieu, en limitant au maximum l'angoisse des animaux (regroupement par cage) et en les observant quotidiennement. S'agissant d'un projet nécessitant la mesure de comportement, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation des animaux. Le besoin en animaux s'évalue à 106 sur 3 ans.

13466 Le vieillissement ou l'activité physique inadéquate sont à l'origine d'une forte augmentation de l'arthrose et des soins médicaux associés. Le traitement de cette dernière par pose d'une prothèse totale de genou est d'autant plus préoccupant que l'on prévoit une augmentation de plus de 600% de cet acte chirurgical ainsi que de la révision des prothèses dont la durée de vie est limitée (entre 10 et 25 ans). Ainsi, tous les services médicaux doivent optimiser la rapidité et l'efficacité des

traitements pour répondre à ces besoins croissants. Pour continuer à proposer des solutions toujours plus performantes dans la prise en charge de l'arthrose, l'expertise sur un modèle d'arthrose animale est essentielle. Ce dernier reste à l'heure actuelle la seule solution non-humaine pour mettre en évidence le potentiel d'une approche thérapeutique et ne peut être substitué ou Remplacé. Les tests courants d'analyse statistique permettent de Réduire le nombre d'animaux à 10 par groupe soit un total de 83 animaux (prise en compte de 3 animaux pour des pré-tests). Ce projet vise à identifier les traitements qui amélioreront le traitement de l'arthrose. Cet aspect physiopathologique particulier est fondamental pour améliorer, par exemple, l'efficacité de l'arthroplastie totale de genou ou le recours à des exoprothèses permettant de soulager l'articulation. Notre stratégie novatrice permettra d'analyser la récupération réelle de l'animal (rat sprague-dawley) au travers de tests comportementaux (locomotion etc.) mais aussi des mécanismes nerveux de régulation de ce dernier. Une attention est donc particulièrement mise sur le bien-être des rats au sein du laboratoire (R de Refinement ; 2 animaux par cage adaptée équipée d'enrichissement spécifique). De plus, chaque procédure chirurgicale se fera sous anesthésie (volatile pour les différentes injections ; mélange binaire – anesthésique général et sédatif – pour les procédures d'implantation) suivie de l'administration d'un antalgique permettant de favoriser le confort de la phase de réveil du rat (dérivé de morphine). Les animaux seront suivis quotidiennement en considérant certains signes (prostration, déshydratation, plaies éventuelles) comme étant rédhibitoires pour la continuité de l'expérimentation. Ainsi, ce projet servira à développer des collaborations avec des laboratoires d'ingénierie tissulaire du cartilage afin de proposer des stratégies novatrices en termes de lutte contre l'arthrose sévère.

13467 L'insuffisance cardiaque après une ischémie cardiaque (notamment après un infarctus du myocarde) est une maladie fréquente, chronique, et fortement invalidante. Elle expose les millions de patients atteints à une limitation de la vie quotidienne et à des ré-hospitalisations fréquentes. Les traitements actuels luttent contre les symptômes de l'insuffisance cardiaque mais il n'existe pas de traitement permettant d'améliorer directement la constitution du muscle cardiaque, en limitant notamment la perte de muscle et son remplacement par un tissu fibreux incapable de se contracter. Ce projet cherche à mieux comprendre les mécanismes contribuant au développement de la fibrose cardiaque aux dépens du muscle cardiaque et ainsi à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'éviter ou de retarder les complications cardiaques liées à la fibrose cardiaque et donc le développement de l'insuffisance cardiaque.

Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes cardiaques pathologiques et de tester de nouveaux principes thérapeutiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modèles cellulaires ne peuvent refléter la complexité de la pathologie humaine. Les modèles chez la souris restent donc les meilleurs pour étudier ces processus.

La souris est un modèle de choix pour l'étude de l'ischémie myocardique. En réponse à une ischémie, le coeur de la souris développe en effet des modifications de sa structure et de son contenu qui sont très proches de celles observées chez l'homme. Il existe notamment un remplacement du muscle par un tissu fibreux, mécanisme étudié dans ce projet. De plus, la fonction cardiaque peut être mesurée par des techniques d'imagerie non-invasives qui permettent de bien caractériser le développement de la fibrose cardiaque.

Le nombre total de souris nécessaires à la réalisation de ce projet est de 1350 pour une durée de 4 ans. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. La taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats a été calculée grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales, l'administration de nouveaux traitements à action anti-fibrosante, et une évaluation de la fonction et de la structure cardiaque à l'aide d'exams d'imagerie.

Pour éviter toute souffrance, toutes les procédures de chirurgie sont réalisées sous anesthésie générale. Des traitements antalgiques sont utilisés afin de réduire au maximum la souffrance

animale. Une grille d'évaluation des points limites est mise en place et utilisée pour activer les mesures d'accompagnement améliorant le bien-être de l'animal. Tout signe de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'identifier une nouvelle cible thérapeutique limitant le développement de la fibrose cardiaque. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouveaux traitements adaptés pour des millions de patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

13468 Le sepsis se définit par une réponse inflammatoire généralisée et dérégulée de l'organisme face à une infection, ayant pour conséquence l'apparition de défaillances d'organes, pouvant amener au décès dans 20 à 50% des cas malgré une prise en charge adaptée. De plus, le sepsis peut entraîner chez les survivants des séquelles à type de vieillissement accéléré musculaire (faiblesse, fatigabilité), source de handicap. Ce sont les patients survivants les plus graves initialement qui ont des séquelles de type vieillissement accéléré.

Le RAGE, pour récepteur aux AGE (produits de glycation avancée), est un récepteur cellulaire impliqué dans les voies de l'inflammation.

L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle de ce récepteur RAGE dans la faiblesse musculaire survenant après un sepsis. Etant donné que les mécanismes conduisant aux séquelles à long terme des patients hospitalisés pour une infection grave sont encore inconnus, l'étude de souris ayant atteint un niveau de gravité initial correspondant à un sepsis (mortalité de 0% à H17) avec une mortalité de 20 à 50% à J7 avec traitement et létal sans traitement (comme chez l'homme) est encore nécessaire actuellement.

Nous utiliserons des souris C57Bl6 adultes (mâles et femelles avec un rapport de 1/1), génétiquement modifiées (n'exprimant plus le RAGE mais sans aucun symptôme lié à la délétion génétique) et des souris de génotype sauvage avec un rapport de 1/1. Les animaux subiront tous soient une injection intra-abdominale de glycérol (groupe contrôle), soit une injection intra-abdominale de selles de souris sauvages (groupes septiques) avec un rapport de 1/3,3. L'injection intrapéritonéale correspondra au début de l'expérimentation (temps zéro ou T0).

Les expérimentations sont prévues chez 870 animaux sur 5 ans : 202 animaux contrôlent (gravité légère) et 668 animaux septiques (gravité sévère pendant les 96 premières heures au maximum puis moyenne à légère pendant les 72 heures suivantes). Nous étudierons 3 groupes d'animaux septiques avec des niveaux croissants de gravité : un 1er groupe septique traité à 12 heures de l'induction de la péritonite par antibiotiques et hydratation (20% de mortalité prédite entre 20 et 96 heures) sera étudié soit pendant 17 heures soit pour une durée maximale de 7 jours, un 2ème groupe septique traité à 24 heures de l'induction de la péritonite (50% de mortalité prédite entre 20 et 96 heures) sera étudié soit pendant 17 heures soit pour une durée maximale de 7 jours, un 3ème groupe septique non traité (100% de mortalité prédite entre 20 et 96 heures) ne sera étudié que pour une durée limitée à 17 heures afin d'éviter des souffrances prolongées inutiles.

Parmi les animaux septiques et les contrôles 316 subiront une procédure supplémentaire : 176 une procédure supplémentaire de gravité légère (consommation d'oxygène ou échocardiographie), 68 une procédure sous sédation de classe sans réveil (force musculaire contractile) et 72 six procédures de gravité légère suivies d'une procédure sous sédation de classe sans réveil (force musculaire contractile).

Ce projet intègre la règle des 3R :

REPLACEMENT - Il n'existe pas d'approche *in vitro* alternative car les conséquences du sepsis sont liées à des effets directs de l'agent pathogène (bactéries) d'une part mais surtout par la réaction inappropriée de l'ensemble de l'organisme de l'hôte (la souris) d'autre part.

RAFFINEMENT - Un enrichissement de l'environnement, des protocoles de surveillance et d'analgésie-anesthésie sont prévus, ainsi que l'utilisation de points limites comme substitut de mortalité.

Les animaux seront surveillés (poids, température, score de gravité du sepsis, bien-être) de manière biquotidienne initialement puis selon le niveau de gravité des conséquences du sepsis. La durée

prévue de l'étude sera de 17 heures pour 336 animaux et de 7 jours pour 534 animaux. Les 316 animaux qui subiront une ou plusieurs procédures supplémentaires à l'injection intrapéritonéale (selles ou glycérol) seront évalués immédiatement avant le début de chaque procédure afin de vérifier que leur état clinique est compatible. En cas de niveau de gravité trop important la procédure ne sera pas réalisée. Tous les animaux atteignant la durée prévue de fin d'étude et ceux atteignant un point limite avant la fin prévue de l'étude seront mis à mort par dislocation cervicale en vue de prélèvements musculaires squelettiques pour des analyses biochimiques, histologiques et de respiration mitochondriale post-mortem.

La durée d'étude du groupe septique non réanimé (100% de mortalité prédite entre 20 et 96 heures) sera limité à 17 heures afin d'éviter des souffrances prolongées inutiles chez des animaux qui ne pourront pas être étudiés à 7 jours.

REDUCTION - Le nombre d'animaux nécessaire a été calculé de manière à permettre une validation statistique des résultats expérimentaux avec un minimum d'individus, en intégrant la proportion de décès liée au sepsis attendue dans chaque groupe. Les 6 tests de motricité et de sensibilité ainsi que l'analyse de la force musculaire contractile seront réalisés de manière consécutive chez les mêmes animaux car ils sont à la fois réalisables de manière acceptable (bien-être et performances éthiques) et sans conséquence de résultats les uns sur les autres (performance scientifique).

Les résultats de tous les animaux inclus dans l'étude (y compris ceux mis à mort avant la fin de la durée prévue de l'étude en raison de l'apparition d'un point limite) seront pris en compte pour l'analyse finale des données.

Afin de limiter le nombre de souris RAGE KO générées par l'établissement fournisseur, nous incluons à la fois des souris mâles et femelles avec un rapport de 1/1.

13469 La dépression, les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) ou encore les troubles de l'attention avec ou sans hyperactivité constituent des pathologies neuropsychiatriques dont la prise en charge reste difficile. Ces troubles résulteraient en partie de perturbations de la transmission impliquant la noradrénaline dans le système nerveux central conduisant à un dysfonctionnement des cellules qu'elle contrôle.

Dans ce projet nous nous proposons d'identifier les cellules cibles de la noradrénaline (c'est à dire les cellules exprimant les récepteurs à la noradrénaline) dans le cervelet et de préciser le rôle fonctionnel de certains de ces récepteurs dans le contrôle de l'activité des neurones. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de souris sauvages ainsi que de différentes lignées de souris génétiquement modifiées permettant l'identification moléculaire des populations cellulaires activées dans le cervelet en réponse à la noradrénaline.

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante.

Réduire:

Cette étude anatomo-fonctionnelle s'articulera autour de 2 objectifs qui impliqueront 3 procédures expérimentales (classes légères à modérées).

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 570 sur une période de 3 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées. Dans le but d'une exploitation maximale des données obtenues, outre les cervelets, d'autres régions cérébrales des animaux utilisés seront prélevés et analysés.

Raffiner:

Toutes les souris seront utilisées de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Les animaux seront hébergés en groupe dans des environnements enrichis (nids végétaux). Afin de diminuer le stress, les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs avant chaque procédure expérimentale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de

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

Remplacer:

Le projet ayant pour but de caractériser et d'identifier les voies de signalisation intracellulaires activées dans le cervelet par la noradrénaline il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

13470 L'hyperactivité vésicale se caractérise par des contractions involontaires de la vessie avec la survenue d'une urgenturie (désir soudain, impérieux et fréquemment irréprouvable d'uriner) avec ou sans incontinence urinaire. Cette hyperactivité vésicale est habituellement associée à une pollakiurie (augmentation de la fréquence mictionnelle pendant la journée) et/ou à une nycturie (besoin d'uriner réveillant le patient) pouvant avoir des répercussions importantes sur la vie des patients.

Le modèle d'isovolumétrie permet d'examiner le comportement de la vessie dans un système isolé tout en conservant une fonctionnalité du système nerveux. En effet, la vessie est ligaturée au niveau des uretères et de l'urètre, supprimant sa capacité à se vider, créant ainsi un système isovolumétrique. La vessie est remplie progressivement jusqu'à obtention de contractions vésicales rythmiques d'amplitude et de fréquence similaires.

Le but de ce projet sera d'évaluer l'effet de candidats médicament sur l'amplitude et la fréquence des contractions vésicales rythmiques lors de procédures classées sans réveil. Les méthodes alternatives, permettant une évaluation pharmacologique sur l'hyperactivité vésicale sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement de cette pathologie.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 900 rats et 600 cobayes à raison de 12 animaux par groupe expérimental avec pour une étude 5 groupes expérimentaux (un groupe véhicule, un groupe molécule de référence et trois groupes expérimentaux (3 molécules différentes ou une molécule à trois doses différentes). Ainsi, une étude type comprendra 60 animaux.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit auprès des animaux (tunnels, huttes ou morceaux de bois). Les animaux seront nourris ad libitum et hébergés en groupe ; ils ne seront séparés qu'en cas de comportement agressif. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé quotidiennement.

En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermostatée.

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

13471 Les neuropathies périphériques chimio-induites (CIPN) sont un véritable problème en oncologie. En effet, un certains nombres d'anticancéreux sont neurotoxiques. En fonction de l'anticancéreux et des doses cumulées reçues par les patients, ces CIPN peuvent affecter jusqu'à 90% des patients. Ces neuropathies sont associées à des fourmillements, des hypersensibilités tactiles ou thermiques douloureuses et à des douleurs spontanées affectant principalement les extrémités des membres. Ces CIPN sont d'autre part associées à une neuropathie motrice responsable d'une faiblesse musculaire chez les patients et d'une diminution des réflexes, mettant en cause une neurotoxicité sur les nerfs moteurs. Cependant, l'atteinte musculaire n'a quasiment pas été étudié dans un contexte de CIPN, alors que l'on sait que l'exposition à des agents anticancéreux est responsable d'une atteinte musculaire chez l'animal.

L'objectif de ces travaux consistera à explorer l'atteinte musculaire dans un contexte de CIPN sur différents modèles animaux de CIPN et en comparaison à un modèle de neuropathie traumatique.

Pour ce projet 120 rats males Sprague Dawley seront nécessaires

Pour l'ensemble des expérimentations envisagées, la règle des 3R sera appliquée afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (nombre maximal d'animaux utilisé n=12 par groupe et possibilité de réduire le nombre lors d'analyse intermédiaire), d'avoir recours à des tests validés dans la littérature scientifique et de limiter la souffrance animale (même si l'objet de ces travaux est la neuropathie périphérique souvent associé à de la douleur neuropathique, les choix des doses d'anticancéreux ont été validé dans la littérature scientifique afin d'avoir des animaux dans un bon état général, indispensable pour la qualité et l'exploitabilité des résultats).

Le recours à l'animal demeure indispensable pour reproduire la complexité des symptômes présenté par les patients en clinique, c'est-à-dire l'administration systémique d'un agent anticancéreux, un métabolisme et une symptomatologie clinique avec des anomalies comportementales non accessibles par des tests *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*.

Les animaux seront suivis quotidiennement (week-end compris) afin de détecter tout comportement douloureux anormal. Le développement des modèles de CIPN impose des injections régulières (à minima 2 fois par semaines) avec une pesée des animaux permettant un suivi rapproché de l'animal (pelage, souillure et contrôle des points limites). De plus, le lendemain de chaque injection, un contrôle de l'état des animaux est réalisé. Ce suivi est réalisé classiquement avec ce type de modèle animal. Comme l'objectif de l'étude est l'évaluation des troubles neuropathiques, il ne sera pas envisageable de prendre en charge les douleurs par un traitement antalgique conventionnel. Il n'est aussi pas possible d'enrichir l'environnement des animaux car cela interfère avec la symptomatologie et le comportement animal (réduction de l'anxiété, modulation différentielle des troubles nociceptifs). Cet enrichissement environnemental pourrait induire des différences de réponses du modèle animal par rapport à la littérature et lui-même être responsable d'une consommation d'animaux.

Cependant, la procédure de chirurgie permettant la réalisation du modèle de neuropathie traumatique sera réalisé sous anesthésie générale avec une analgésie per opératoire et post opératoire immédiate (12 et 24 heures).

Si un animal manifeste des troubles comportementaux en lien avec une douleur excessive (prostration, vocalisation, isolement dans la cage, pelage souillé, hérissément du poil), il sera alors euthanasié par inhalation de CO₂. Ces modèles sont suffisamment évolués (raffinement du choix des doses d'anticancéreux), de telle sorte que ce genre de comportement ne se rencontre que très rarement. Aussi, les tests comportementaux permettant d'évaluer les troubles neuropathiques chez les animaux nécessitent d'avoir des animaux dans un bon état général.

Les animaux seront stabulés dans des conditions standards d'au maximum 4 animaux par cage, dans une salle climatisée et auront un libre accès à la boisson et à la nourriture tout au long des expérimentations.

A l'issue du projet les animaux seront euthanasiés pour réaliser des prélèvements de tissus nerveux, de muscle et de sang pour des analyses ultérieures et dans l'objectif d'exploiter au maximum les modèles animaux réalisés.

13472 Selon l'organisation mondiale de la santé, une personne sur trois dans le monde souffre d'hypertension artérielle. Ce facteur de risque est à l'origine de la moitié des décès soit 9,4 millions de morts chaque année. Cette pathologie, caractérisée par une augmentation de la pression artérielle, est associée à des maux de tête le matin, des troubles visuels, des étourdissements mais également à une pollakiurie (envie fréquente d'uriner).

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

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

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de contribuer à leur bien-être. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 540 rats, à raison de 9 animaux par groupe (minimum nécessaire), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

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

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

13473 Le but du laboratoire est de disséquer les événements moléculaires et cellulaires qui ont lieu lors de l'établissement du lignage mélanocytaire lors de l'embryogenèse, lors du renouvellement et du vieillissement, et lors de l'initiation et la progression des mélanomes. Les connaissances générées à partir des biopsies de mélanomes humains, à partir des lignées de mélanomes humains et de mélanocytes humains, nous permettent de tester *in silico*, *in vitro* et *in cellulo* les modifications biochimiques, moléculaires, métaboliques et cellulaires. L'utilisation de systèmes plus complexes (systèmes 3D, sphéroïdes ou peaux reconstituées) nous permet de mieux appréhender l'importance de certaines protéines ou de certaines mutations dans les processus sus-cités.

Bien que les modèles cellulaires soient utilisés majoritairement comme paradigme pour étudier ces processus, il est possible que les modèles cellulaires, même sophistiqués, ne reproduisent pas entièrement les événements qui se produisent lors du développement embryonnaire, lors du renouvellement des mélanocytes, lors de la transformation des mélanocytes en mélanome. De plus, la recherche systématique de traitement contre le mélanome a révélé que l'hétérogénéité cellulaire au sein d'un mélanome engendre des résistances génétiques et épigénétiques qui ne sont pas reproductibles *in vitro*. En conséquence, l'utilisation de modèle physiologique sophistiqué est obligatoire dans un but cognitif et thérapeutique.

L'espèce choisie est la souris car il s'agit de l'espèce de choix pour mettre en œuvre l'ensemble des techniques de transgénèse et de ciblage moléculaire. De plus, la souris est un modèle reconnu pour étudier la robe chez les mammifères. Ce modèle animal nous permet (i) de générer des mutations spécifiques, conditionnelles ou non, dans le lignage mélanocytaire (les mélanocytes ne sont pas essentiels à la vie ni au bien-être de l'animal), (ii) de contrôler au mieux le fond génétique ce qui permet de réduire le nombre d'animaux car la variance est plus faible. Ainsi, 8646 souris seront utilisées dans le présent projet. Par ailleurs, aucune douleur de l'animal n'est observée lorsque le renouvellement des mélanocytes n'a pas lieu ; les souris deviennent blanches. Les seules douleurs qui sont possibles peuvent avoir lieu lorsque les souris développent des mélanomes. Ces mélanomes sont facilement observables dès l'initiation et avant invasion lorsqu'une douleur peut, éventuellement, se manifester. Il est donc très facile de suivre, de surveiller, de soulager, voire de sacrifier les animaux développant des mélanomes.

13474 Les formations proposées doivent permettre aux apprenants (personnel médical et paramédical : chirurgiens, médecins, infirmières, internes en chirurgie, vétérinaires, et scientifiques) d'acquérir la pratique des différentes techniques chirurgicales (acquisition d'une gestuelle sûre et précise, augmentation de la rapidité de réalisation des opérations en clinique) et une utilisation efficace du matériel de chirurgie, de microchirurgie et en robot-chirurgie et du bloc opératoire en général.

En accord avec les 3R et dans un but de remplacement, les enseignements pratiques sont tout d'abord dispensés :

- sur simulateurs numériques qui reproduisent virtuellement une partie des opérations chirurgicales de différentes spécialités, afin d'initier l'apprentissage des gestes de base.
- sur pièces artificielles (peau artificielle, tubes silicone),
- et sur pièces anatomiques (cœurs, pieds de cochons, vessies, reins, colons, yeux issus de la boucherie ou prélevés sur des animaux en fin d'expérimentation)

En fin de parcours pédagogique seulement et pour les spécialités où pédagogiquement cela apporte une plus-value, les étudiants/stagiaires peuvent appliquer ces procédures sur l'animal afin d'appréhender l'opération avec toute la complexité d'un organisme entier. Le modèle animal permet l'application de techniques chirurgicales complexes et le perfectionnement du personnel dans de très nombreuses spécialités telles que la chirurgie cardiaque, la chirurgie thoracique, la chirurgie vasculaire, la chirurgie digestive, la chirurgie urologique, la chirurgie gynécologique, la chirurgie pédiatrique, la chirurgie orthopédique et la neurochirurgie. Ces enseignements pratiques sont dispensés sur cochons et moutons. La microchirurgie, qui est la réalisation sous microscope de sutures vasculaires et nerveuses, est une spécialisation complémentaire qui sera enseignée sur modèle murin (rat).

Afin de réduire au maximum l'utilisation des animaux, le nombre est défini selon le nombre d'étudiants. L'enseignement sera de bonne qualité avec 1 gros animal (cochon ou mouton) pour 3 étudiants pour la chirurgie générale, et 10 rats/personne dans le cadre d'une formation spécifique microchirurgie.

Les différentes espèces sont hébergées dans des conditions répondant à la réglementation en vigueur (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques), en groupe pour les animaux sociables, et avec un enrichissement adapté :

- pour les rats : tunnels et buchettes
- pour les cochons : balles et mordillos
- pour les moutons : foin, sel et ballons

Toutes les opérations sont réalisées sous anesthésie générale avec prise en charge de la douleur par administration d'un traitement antalgique en continu (raffinement) sans reprise de conscience avant la mise à mort de l'animal en fin de séance.

Pour les gros animaux : l'animal sera scopé, c'est-à-dire que sa fréquence cardiaque et respiratoire sont suivies en continu. Toute modification de ces paramètres indiquant un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal (par exemple augmentation 20% de la fréquence cardiaque) induirait alors un réajustement immédiatement des traitements anesthésiques.

Pour le petit animal, la profondeur de l'anesthésie sera vérifiée très régulièrement en testant les réflexes de l'animal (réflexe pupillaire)

En se basant sur les statistiques des 5 dernières années, 300 rats, 10 moutons et 150 cochons par an seront nécessaires à ce projet de formation soit pour 5 ans (durée : 1500 rats, 50 moutons et 750 cochons).

13475 La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire auto-immune, démyélinisante, dont la fréquence aujourd'hui touche plus de 2.3 millions de personnes dans le monde. Sa prévalence est variable selon les régions, elle reste élevée en Europe et en Amérique du Nord (> 100 pour 100 000 habitants) et relativement faible en Asie de l'est et en Afrique Sub-saharienne (2 pour 100 000 habitants). On notera que les femmes sont plus touchées que les hommes, cette différence d'incidence de la maladie serait attribuée à des différences physiologiques, en partie hormonales. Ces 20 dernières années, l'incidence de la sclérose en plaque ne cesse d'augmenter, on estime entre 70 000 et 90 000 le nombre de patients atteints en France.

Des modèles animaux de sclérose en plaques existent et ont permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette maladie auto-immune. La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire du système nerveux central, caractérisée par l'apparition de plaques de démyélinisation (destruction de la gaine de myéline des neurones) responsables d'un déficit de la conduction nerveuse dans la zone concernée : le déficit musculaire résultant dépendra de la zone atteinte.

Actuellement, les traitements utilisés en clinique humaine pour soulager ces déficits et les douleurs neuropathiques associées ont été étudiés et validés dans ces mêmes modèles animaux. Les méthodes alternatives qui permettraient d'éviter les études sur l'animal sont inexistantes, la

complexité des mécanismes mis en jeu dans le développement de la démyélinisation neuronale et la chronicité de cette maladie rendent incontournable le recours à ces modèles animaux.

Le projet décrit dans cette demande a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules ou thérapies sur le développement des déficits musculaires et/ou des douleurs neuropathiques associées et d'en préciser les modalités d'action. En parallèle, une analyse biochimique du contenu tissulaire des zones concernées, associée à une approche innovante par imagerie sur l'animal entier sera utilisée, afin de caractériser de nouveaux marqueurs biologiques de la sclérose en plaques.

Ce projet concerne 280 souris sur une période de 5 ans pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : l'utilisation des animaux ne se fera qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *ex vivo*.
- Réduction des animaux : le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé, le nombre d'animaux est réduit à son minimum pour chaque groupe.

- Raffinement : Lors de la procédure expérimentale, l'enrichissement du milieu d'hébergement est fortement contrôlé, la manipulation des animaux est délicate et limitée. Une évaluation des animaux est faite au minimum une fois par jour, selon une grille de scores spécifiques qui prend en compte des paramètres physiologiques, tels la prise de poids mais également des critères décrivant de façon précise l'apparence physique et le comportement général de chaque animal. L'addition des scores obtenus chaque jour de la procédure expérimentale pour chaque animal permet ainsi d'intervenir au plus tôt dans la prise de décision de la poursuite ou non du protocole pour un animal concerné en fonction de son état général, avant d'atteindre les points limites fixés par la procédure. Les points limites sont les suivants:

1/ défaut d'alimentation et/ou de boisson sur une période de 48h se traduisant par un amaigrissement et une déshydratation ;

2/ perte de poids > 20 % du poids normal, maintenue sur 72h

3/ hypothermie persistante, décelée par un animal froid au toucher ;

4/ difficulté respiratoire avec augmentation du rythme respiratoire ;

5/ plaie nécrosée, purulente ou exsudative ;

6/ paralysie des 4 membres ;

7/ trauma auto-induit persistant i. e. lorsque l'animal va lécher, mordre, griffer ou secouer la lésion, automutilation ;

8/ animal non réactif à la stimulation (prostré) ; dos voûté ;

En cas de dépassement, les animaux seront euthanasiés selon la méthode prévue dans le projet.

13476 Les modèles d'étude *in vitro* ne permettent d'obtenir qu'un nombre limité d'informations. C'est pourquoi il est souvent indispensable d'utiliser l'animal afin de pouvoir étudier, par exemple, le rôle d'un gène ou d'une protéine au sein d'un organisme entier. Les techniques de transgénèse consistent à introduire ou à modifier un gène dans un organisme vivant afin d'en étudier sa fonction. Ce sont des techniques particulièrement pointues nécessitant un matériel coûteux et du personnel spécialisé. Notre plateforme est spécialisée dans la production à façon de modèles murins transgéniques par transgénèse additionnel ou par recombinaison homologue ou par approche CRISPR, pour des clients du centre de recherche ou extérieurs. La production de souris génétiquement modifiées nécessite un nombre important de souris mâles et femelles mais le fait de travailler en plateforme permet de réduire les différents lots de souris, notamment les lots de mâles qui sont utilisés pour plusieurs projets.

Le nombre de souris utilisé sera proportionnel au nombre de projets réalisés par an. Notre activité est estimée à 50 projets maximum pour la durée du projet. Le nombre total estimé de souris utilisées au maximum pour le projet sera donc de 16465. La création de modèles animaux transgéniques

nécessite de fait l'utilisation d'animaux pour fournir les embryons qui sont injectés avec les outils moléculaires porteurs de la modification génétique. Les modèles sont créés en fonction de la demande de clients qui ont eu une validation de leur projet scientifique. On peut donc affirmer qu'il n'existe pas de méthodes alternatives à la création d'un modèle murin afin de répondre à la question scientifique du projet. Le chercheur et notre plateforme auront bien entendu vérifié au préalable dans les bases de données existantes que le modèle projeté n'existe pas afin d'éviter la duplication d'un modèle de souris. Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, les lots de mâles fertiles sont changés 2 à 3 fois par an en fonction du fonds génétique et sont utilisés pour tous les projets initiés pendant cette période. La superovulation des femelles est préférée à l'accouplement naturel afin de diminuer la quantité de souris utilisée et augmenter la production d'embryons. Seules les femelles présentant un bouchon vaginal sont prélevées. Les femelles qui ne se sont pas accouplées sont réutilisées après un temps de latence de 15 jours pour un nouveau projet de transgénèse. Afin de ne pas utiliser trop d'animaux, les séances d'injections sont arrêtées dès l'obtention de cinq souris transgéniques. Il arrive parfois qu'aucun fondateur ne puisse être obtenu: les injections seront alors stoppées après la réimplantation de 15 à 20 femelles porteuses. Les animaux bénéficieront d'anesthésie, de chauffage pendant les anesthésies, et d'apport de nourriture énergétique pour les petits au sevrage et facile d'accès (DietGel haute énergie).

13477 Dans un contexte d'évaluation des risques écotoxicologiques et de biologie de la conservation, ce projet d'une durée de 5 ans s'intéressera aux variations spatio-temporelles de l'exposition de Mammifères aux contaminants chimiques (Eléments traces métalliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides) et biologiques (Pathogènes), au transfert de ces contaminants de l'environnement vers les Mammifères, ainsi qu'aux effets néfastes induits.

Les Mammifères concernés sont des rongeurs (Campagnols et Mulots), des insectivores (Musaraignes) et des carnivores (Belette et Hermine).

Les zones d'étude sont le secteur de Metaleurop Nord (Nord – Pas-de-Calais, 7 sites d'étude), contaminé par des activités métallurgiques, et des zones agricoles d'intensification croissante dans la Zone Atelier Arc Jurassien localisée en Franche-Comté (ZAAJ, 4 à 8 sites d'étude).

Pour les rongeurs, pour chaque zone d'étude, les effectifs annuels souhaités sont de 20 animaux pour les 3 espèces dominantes, ce qui représente 660 à 900 individus par an. Sur la zone d'étude de Metaleurop Nord, aucun sacrifice d'animaux n'est envisagé. Sur les 4 à 8 sites de la ZAAJ, 10 individus des 3 espèces dominantes (qui seront déterminées lors des 1ères sessions de capture) seront euthanasiés par dislocation cervicale afin d'étudier les contaminants chimiques et biologiques dans les tissus. Le nombre d'animaux sacrifiés sera compris entre 120 à 240 individus selon que 4 ou 8 sites auront été étudiés. Pour les mustélidés, les effectifs souhaités sont de 100 hermines et 200 belettes sur 5 ans.

Les animaux seront capturés à l'aide de pièges non létaux relevés au moins une fois par jour. Les animaux seront anesthésiés par isoflurane grâce à un appareil d'anesthésie portable, identifiés à l'espèce, sexés, pesés, mesurés et, sur les rongeurs uniquement, une prise de sang sera effectuée dans le sinus rétro-orbitaire. L'implantation sous-cutanée de transpondeurs sera réalisée sous anesthésie sur les mustélidés et les rongeurs. Les animaux seront maintenus en cage contenant du foin et de la nourriture pendant 1 heure, permettant d'observer leur réveil et leur comportement. Si leur état de santé est jugé satisfaisant, ils seront relâchés sur leur lieu de capture.

En ce qui concerne les exigences de remplacement, aucune technique *in vitro* ou de modélisation ne permet, à l'heure actuelle et à notre connaissance, de répondre aux objectifs scientifiques du présent projet. Les effectifs souhaités, particulièrement ceux des individus sacrifiés, tiennent compte de la règle de la réduction, d'impératifs techniques (Il faudra « pooler » les tissus de plusieurs individus pour avoir la masse de tissu biologique permettant les analyses) et d'impératifs statistiques (en « poolant » 2 individus, l'effectif serait de 5 par site, ce qui constitue une limite inférieure en termes de comparaisons statistiques). En termes de raffinement, les captures et manipulations sont effectuées en silence et aussi rapidement que possible, par du personnel expérimenté, en maintenant les animaux dans les pièges et/ou dans des cages à l'obscurité autant que possible, afin de diminuer au maximum le stress de la capture. La faisabilité de remplacer le prélèvement

rétro-orbitaire par un prélèvement mandibulaire, a priori moins risquée, sera testée dans le cadre du projet.

13478 La douleur a été étudiée sur une variété importante de modèles animaux et la quasi-totalité des antalgiques disponibles actuellement sur le marché ont été testés dans des modèles précliniques chez le rongeur. Ces modèles tendent à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses.

L'activité du laboratoire vise à évaluer les propriétés antalgiques de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique majoritairement. Afin d'offrir à ces clients un service de screening leur permettant de discriminer rapidement des composés efficaces dans le domaine de la douleur parmi un panel de composés ou de fournir un profil d'activité pharmacologique d'un ou plusieurs composés, le laboratoire propose à ces clients un service de screening *in vivo* à haut débit. Cette offre s'appuie sur une sélection de 11 modèles de différentes aires thérapeutiques (douleur aiguë, inflammatoire, viscérale, neuropathique et post-opératoire) et tests comportementaux permettant d'appréhender les multiples composantes de la douleur. Ces études d'efficacité antalgique sont exclusivement réalisées chez le rat, offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Cette activité s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Ce service est particulièrement raffiné grâce à une sélection fine et précise des 11 modèles et tests utilisés. L'objectif de ce service est également de réduire le plus possible le nombre d'animaux utilisé en s'appuyant sur des données robustes tirées d'une base de données en perpétuelle croissance du laboratoire.

Dans le cadre de ce service, le nombre d'animaux estimés pour la totalité du projet (5ans) est de 8400 rats pour 40 molécules évaluées chaque année.

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

13479 Les maladies génétiques liées à des déficits du métabolisme de certaines molécules (les donneurs de méthyle) sont causées par des mutations dans les gènes codant les protéines impliquées dans ce métabolisme. Parmi ces gènes, le gène de la Méthionine synthase (Mtr) joue un rôle central et des mutations délétères entraînent une maladie appelée Homocystinurie-anémie mégaloblastique, groupe cblG. Cette maladie rare a une prévalence de 1 sur 1 million et présente des symptômes tels qu'une anémie mégaloblastique sévère ainsi que des troubles neurologiques variés (retard développemental, atrophie cérébrale, hypotonie, crises d'épilepsie, ataxie). Pour comprendre les mécanismes de cette pathologie et rechercher de nouvelles pistes thérapeutiques, nous avons développé un modèle de souris transgénique permettant l'inactivation conditionnelle du gène Mtr dans le cerveau. Cette lignée de souris nous sert de modèle pour l'étude de la pathologie humaine, et nous l'utiliserons pour tester l'effet d'une déficience en Méthionine synthase sur le renouvellement des cellules souches neurales.

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car l'étude porte sur le développement du système nerveux central chez la souris déficiente pour le gène Mtr.

2. Réduction : l'étude portera sur des groupes mâles + femelles de souris de laboratoire, réparties en 2 groupes d'études selon le génotype : contrôle (sauvage) ou invalidé pour le gène MTR (KO MTR). 16 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (traitement pharmacologique, sacrifice) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal. Une procédure

d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques.

13480 Nous étudions une protéine essentielle à la contraction musculaire, dont l'absence totale est létale chez la souris comme chez l'homme.

Et, chez l'homme, une réduction de la quantité de protéine conduit à une myopathie dont la sévérité semble proportionnelle à la quantité de protéine. Les patients les plus sévèrement atteints présentent une réduction de 70% à 90% de cette protéine. Nous avons déjà développé un modèle murin pour ces myopathies dans lequel l'extinction du gène correspondant est insuffisante pour représenter ces patients les plus sévèrement affectés. Dans un nouveau modèle, nous allons réduire davantage l'expression du gène. Nous étudierons la composition, la structure du muscle et la force musculaire des 300 animaux impliqués dans ce projet. Ceci doit nous permettre de comprendre le rôle de cette protéine dans la formation et le maintien de l'intégrité musculaire, et le développement de la myopathie. A terme, il s'agit de trouver de nouvelles approches thérapeutiques.

Même s'il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique pour mener une telle étude, tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour appliquer au mieux la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie ; un suivi quotidien de leur bien-être sera assuré. Nous avons une bonne connaissance d'un autre modèle de myopathie sur lequel nous travaillons, ce qui nous a permis de définir des points limites parfaitement adaptés. Nous sommes donc également en mesure d'adapter les conditions d'hébergement en fonction de l'évolution de la pathologie.

Enfin, le nombre d'animaux par groupes est ajusté pour optimiser l'interprétation statistique des informations.

13481 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 17% des décès (Organisation Mondiale de la Santé, 2012). En France elles causent chaque année 150 000 morts, dont 27% associés à un infarctus et 23% à l'insuffisance cardiaque (Société Française de Cardiologie, 2015).

L'arythmie cardiaque est un problème du rythme de contraction des différentes structures du cœur, qui vont battre irrégulièrement et de manière désordonnée. Bien que certaines arythmies cardiaques soient bénignes et sans symptômes, d'autres peuvent être particulièrement graves et conduire à une baisse d'apport en oxygène aux organes (et notamment au cerveau) ou encore à une mort inattendue et soudaine, la mort subite. S'ils se développent aussi chez l'adulte sain, la majorité de ces troubles est associée à une maladie cardiaque sous-jacente. En France on estime que près de la moitié des décès liés à l'insuffisance cardiaque sont dus à des arythmies ventriculaires graves conduisant à la mort subite (Fondation pour la Recherche Médicale, 2014). Les traitements pharmacologiques restent aujourd'hui peu nombreux (b-bloquant, inhibiteurs des canaux potassiques), et ont montré une efficacité limitée et, surtout, des effets secondaires graves, surtout pro-arythmiques. Si aujourd'hui le défibrillateur implantable reste l'unique thérapie efficace, son utilisation reste invasive (pose après ouverture de la veine jugulaire), extrêmement traumatisante pour le patient (décharge électrique à l'état éveillée, douleur) et limitée à certains centres hospitaliers.

Dans ce contexte, la mise en place d'un modèle d'arythmie ventriculaire *in vivo* reste une étape clé dans l'évaluation de l'efficacité de candidat médicament, ; les modèles *in vitro*/*in silico* n'ayant à ces jours pas encore été validés dans la littérature. Dans ce contexte, l'utilisation d'un modèle porcin se justifie ici par une similitude anatomique et physiologique avec l'Homme (fréquence cardiaque, hémodynamique, électrophysiologie). Ce projet s'intègre dans l'évaluation pharmacologique d'un candidat médicament. L'administration au porc constitue ainsi une étape essentielle dans le processus de sélection. Le comportement de la molécule au sein d'un organisme proche de

l'Homme est donc indispensable dans la prédictivité vers un modèle préclinique et clinique. Cette étape intervient après avoir collecté des données de sélectivité, d'efficacité et de sécurité *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo*, chez d'autres espèces.

Dans notre laboratoire nous avons mis au point un modèle d'arythmie ventriculaire chez le porc sain, anesthésié tout au long de l'étude et sans réveil consécutif. L'arythmie est induite pharmacologiquement au cours d'une administration aiguë de caféine, reconnue pour induire cliniquement et expérimentalement des troubles du rythme. Avant expérimentation, l'animal sera anesthésié puis intubé et ventilé tout au long du protocole expérimental. Un traitement analgésique sera administré avant de débiter la phase chirurgicale pour potentialiser les effets anesthésiants. Avant l'expérimentation les porcs sont hébergés en groupes dans des boxes enrichis de litière végétale dans laquelle leur aliment est dispersé afin de stimuler leur instinct de fouissage, ils bénéficient également de balles de jeux et d'éléments à mordiller.

Cette mise au point a fait l'objet d'une première demande d'autorisation de projet, en novembre 2018. Dans cette première partie, nous avons d'une part déterminé la faisabilité de ce modèle en déterminant la voie d'administration de la caféine (voie intraveineuse, voie intracoronaire) ainsi que la dose optimale permettant d'obtenir un modèle d'arythmie répétable et reproductible, nous permettant par la suite de limiter le nombre d'animaux nécessaire pour des études pharmacologiques. A ce jour toutes ces conditions ont été déterminées et ont montré une efficacité totale dans l'induction d'arythmie ventriculaire.

Dans le cadre de cette seconde demande, nous souhaitons poursuivre la démarche et valider ce modèle à l'aide de traitements de référence dans l'arythmie ventriculaire (b-bloquant, amiodarone) ainsi que des traitements pharmacologiques spécifiques de nos cibles d'intérêt (Procédure 1). Dans le cas où ces deux types de traitements s'avèreraient positifs, et valideraient donc notre modèle, nous poursuivrions ce projet en recomparant leurs effets avec ceux de nos candidats médicaments (Procédure 2). Le design d'étude permettra d'évaluer l'induction d'arythmie avant et après la prise du candidat (ou du traitement de référence) permettant ainsi de raffiner le protocole expérimental et limiter le nombre d'animaux nécessaire pour démontrer un potentiel effet statistique de ces candidats. A l'issue de ce projet celui ayant montré la plus grande preuve d'efficacité anti arythmique dans ce modèle aigu sera réévalué dans un modèle chronique d'insuffisance cardiaque « post infarctus » chez le porc au cours duquel le même protocole sera appliqué.

Ce projet prévoit un total de 90 animaux pour toute la durée de son autorisation (soit 3 années) avec l'intégralité de ses procédures classées sans réveil.

13482 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la troisième cause de mortalité en France. Il est provoqué par un arrêt brutal de la circulation sanguine. Cet arrêt de la circulation du sang ne permet plus un apport suffisant en oxygène et en nutriments entraînant la mort de la zone alentour. Un diagnostic précoce de cet accident est indispensable. Afin de limiter les conséquences de l'AVC, trois molécules sont développées pour la régénération de la zone endommagée.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la répartition et l'élimination de ces 3 molécules chez le rat. Cette étude est nécessaire pour déposer des demandes d'autorisation de mise sur le marché auprès de l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament) et de la FDA (Food and Drug Administration).

Pour ce faire, les 3 molécules seront marquées par radioactivité (radiomarquage) pour le suivi dans l'organisme une fois administrées. Ces molécules radiomarquées sont administrées chez le rat par voie intraveineuse et leur suivi sera effectué par imagerie nucléaire. Les résultats de l'imagerie nous permettront de déterminer les temps clés auxquels les organes seront prélevés pour analyser la quantité de molécule qui s'y trouve. Cette étude sera réalisée à la fois sur des rats sains et sur des rats malades, c'est-à-dire chez lesquels un accident vasculaire cérébrale a été provoqué.

Pour induire une ischémie cérébrale, une occlusion de l'artère cérébrale moyenne est réalisée chez le rat. Durant toute la procédure de chirurgie, l'animal est sous anesthésie gazeuse, et les fonctions vitales sont surveillées jusqu'au réveil, un antalgique est administré en pré et en post-opératoire.

L'utilisation de l'imagerie nucléaire pour suivre les médicaments/molécules est réalisée en temps réel sur des animaux vivants et endormis. Ceci permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car ces animaux peuvent être imagés plusieurs fois. Cette technique d'imagerie permet également de renforcer la pertinence scientifique car le devenir des molécules est évalué non seulement chez différents animaux mais à la fois chez le même animal à différent temps. L'imagerie nous permettra de sélectionner les temps auxquels les mesures sur prélèvements tissulaires seront les plus pertinents.

Cette étude a été conçue dans le respect du bien-être animal en appliquant la règle des 3 R :

Réduire : le nombre minimum d'animaux à utiliser a été déterminé d'après un test statistique (test de Kruskal-Wallis) prenant en compte la variabilité biologique inter-individuelle et les risques dus à la chirurgie (anesthésie, procédure d'induction du modèle d'ischémie). Un nombre de 10 animaux par groupe est nécessaire pour assurer des résultats statistiquement pertinents.

Remplacer : la mise au point du radiomarquage des molécules d'intérêts et l'évaluation de leur suivi chez les animaux sains et malades est un prérequis nécessaire avant le passage chez l'Homme. A ce jour, il n'existe aucun modèle relevant permettant d'éviter l'expérimentation animal.

Raffiner : l'acquisition par imagerie nucléaire n'étant pas une procédure douloureuse, l'animal est maintenu sous anesthésie gazeuse légère uniquement pour limiter ses mouvements et son stress. Dans le cas de l'étude sur animaux avec ischémie cérébrale, après l'intervention chirurgicale les animaux sont surveillés jusqu'à la phase de réveil. Une injection sous cutanée d'un analgésique est réalisée systématiquement pour réduire la douleur. Une grille d'évaluation de la douleur (points limites) a été mise en place et si l'animal atteint un certain score, il recevra une injection sous cutanée d'un analgésique, au-delà, l'animal sera euthanasié.

Une grille d'évaluation de la douleur (points limites) a été mise en place et si l'animal atteint un certain score, il recevra une injection sous cutanée d'analgésique, et si le trouble persiste, l'animal sera mis à mort.

Cette évaluation nécessite l'utilisation de 360 rats sur 5 ans. Les animaux seront sacrifiés en fin d'expérimentation.

13483 Parmi les nombreuses cellules qui composent le système immunitaire, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) ont un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie. Le dysfonctionnement de ces cellules est mis en évidence dans de nombreuses pathologies. Nous avons mis en évidence la forte expression de la molécule Tribbles 1 (TRIB1) dans ces cellules régulatrices et l'interaction physique de TRIB1 avec une molécule centrale dans le développement et la fonction des Tregs, la molécule FOXP3. Cependant la fonction de cette molécule TRIB1 dans les Treg n'est pas connue à ce jour. Par ailleurs, les molécules TRIB (1-3) sont suspectées de participer au développement et à la progression du cancer de la prostate, notamment via le contrôle du système immunitaire et métabolique dans le tissu adipeux. De plus, des études du génome humain associant des SNP de TRIB1 avec une modification du taux de cholestérol sanguin et des triglycérides et le risque cardiovasculaire. Les lymphocytes Tregs sont moins abondants dans le tissu adipeux d'individus obèses que maigres favorisant potentiellement un environnement pro-inflammatoire.

Ce projet vise à étudier le rôle de TRIB1 dans la biologie des Treg, notamment des Treg résidents du tissu adipeux après apport d'une diète enrichie en graisses (high fat diet). L'objectif est donc de démontrer le rôle de TRIB1 dans des modèles immuns et des pathologies immuno-métaboliques associées à l'obésité et au cancer.

Au total, nous avons prévus d'utiliser 232 souris, incluant 84 souris délétées pour le gène Trib1 dans les Treg. Il s'agit cependant d'une estimation haute puisque les objectifs (ie différences significatives) pourront être atteints avant ce nombre.

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

-le nombre d'animaux retenu a été calculé afin de permettre une interprétation fiable, statistiquement justifiable, et suffisante des résultats. Les analyses effectuées seront guidées par

des tests *in vitro* préalables. De plus, les modèles ont été choisis par leur robustesse même si des variabilités ne peuvent être écartées, inhérents à toute expérience *in vivo* (Réduire).

-l'utilisation d'un modèle animal est justifiée par l'absence de système *in vitro* alternatifs permettant de reproduire la complexité multicellulaire d'un organisme et les interactions cellulaires notamment dans le cadre de maladies immunométaboliques (Remplace).

- des mesures antalgiques seront mises en oeuvre afin de limiter la souffrance des animaux, les animaux seront suivis régulièrement. Tous les animaux seront analysés post-mortem pour caractériser la réponse immunitaire (Raffiner).

13484 Les cellules possèdent de nombreux systèmes de contrôle et de réparation des lésions de l'ADN permettant de maintenir l'intégrité du génome. La modification de cette intégrité est une caractéristique des cellules cancéreuses. La recombinaison homologue est un système majeur de réparation de l'ADN. De nombreuses études menées sur des organismes unicellulaires et des cellules en culture ont permis de caractériser ce mécanisme. Cependant l'importance et le rôle exact qu'il joue dans des organismes plus complexes reste à préciser. En particulier le rôle qu'il peut jouer dans la formation, la survie ou le traitement des tumeurs pourra permettre de mieux caractériser et traiter ces dernières. Les acteurs principaux de la recombinaison homologue sont souvent essentiels à la survie et au développement des mammifères, ce qui complique leur étude *in vivo*. Pour cette raison, nous avons choisi une approche qui consiste à exprimer transitoirement une forme non fonctionnelle d'un acteur essentiel et spécifique de la recombinaison homologue : RAD51 (SMRad51). La forme déficiente de cet acteur « empoisonne » transitoirement le mécanisme de réparation. Cette étude menée chez la souris permet d'étudier pour la première fois *in vivo* chez les mammifères un mécanisme essentiel à la survie et la stabilité des cellules prolifératives. Notre approche permet de moduler le temps et le niveau d'expression de la protéine et par conséquent de minimiser les effets chez l'animal. En absence d'expression de la protéine mutante les animaux ne présentent pas de phénotype dommageable. La protéine non fonctionnelle sera induite transitoirement dans toutes les cellules de l'animal grâce à l'injection ou l'ingestion de doxycycline.. Les études menées *in vitro* ont montré que la recombinaison homologue est importante pour la progression correcte de la phase répllicative des cellules souches prolifératives. Pour cette raison, nous étudierons en particulier l'effet de l'expression de la protéine mutante (1) sur des tissus sains et cellules en prolifération (peau, intestin, sang), (2) sur la formation et la progression des cellules tumorales (tumeurs de la peau et tumeurs mammaires), (3) sur la réponse à des agents génotoxiques.

Les jeunes souris en croissance possèdent un plus grand nombre de cellules en prolifération. Pour cette raison nous étudierons aussi l'effet de notre mutant chez de jeunes souris de 12 jours et chez les souris adultes.

Pour ce projet, nous proposons d'utiliser 556 animaux sur 5 ans. Les animaux étudiés dans ce cadre proviennent d'établissements reconnus et sont élevés dans des conditions propices au bien-être animal. Le nombre d'animaux prévu pour ce projet a été réduit au maximum tout en conservant un effectif suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, dont l'état de santé sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de stress ou de souffrance. Les points limites appropriés seront utilisés pour limiter les souffrances des animaux au cours de l'expérimentation. Ce projet est prévu sur une durée maximale de 5 ans ; au cours de cette période les expériences seront menées successivement et tout protocole induisant un stress ou une souffrance inattendue lors des premières expérimentations sera évidemment arrêté.

Ce projet apportera une meilleure compréhension des rôles moléculaires et cellulaires des mécanismes de réparation par recombinaison homologue *in vivo* grâce à l'étude d'un de ces facteurs principaux, RAD51. Mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la recombinaison homologue et les conséquences de leur inactivation *in vivo* doit aider à mieux comprendre leur rôle

dans la tumorigénèse et par conséquent dans le développement de nouveaux traitements anticancéreux.

13485 La fermentation appliquée dans un but de conservation de certains aliments d'origine végétale, modifie leurs propriétés. Une diminution de la teneur en sucre et une augmentation du pouvoir antioxydant ont ainsi été démontrés sur du jus de fruit tropical incubé avec certaines bactéries. L'activité antioxydante des jus de fruits est en partie liée aux polyphénols et ceux-ci semblent capables d'agir *in vitro* comme inhibiteur d'enzymes digestives pancréatiques.

L'objectif du projet est de suivre l'effet de l'ingestion de jus de fruits fermentés sur le métabolisme afin de mettre en évidence l'existence d'une activité bénéfique liée à la fermentation de ces produits. L'étude porte sur des souris C57BL/6J ayant une alimentation conduisant à un état de pré-obésité et donc à une perturbation métabolique progressive. L'expérimentation d'une durée de 6 semaines inclut 4 lots de 10 souris mâles nourries avec un régime riche en graisse et supplémenté soit en jus de fruits (contenant ou non des bactéries), soit en eau sucrée (contenant ou non des bactéries) et un groupe témoin de 6 souris nourries avec un régime riche en graisse non-supplémenté. Trois prélèvements sanguins sont prévus pour mesurer la régulation des marqueurs métaboliques sanguins. Deux tests de tolérance au glucose seront effectués en début et en fin d'expérimentation afin d'évaluer l'état pré-diabétique des souris. Le projet est conçu pour respecter la règle des 3R. Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter les signes de stress ou les comportements anormaux et l'absence de pathologie. Une attention particulière sera portée à la récupération après les prélèvements sanguins pour éviter la souffrance des animaux (Raffiner). Le nombre d'animaux dans chaque groupe est réduit au maximum mais est néanmoins suffisant pour une analyse statistique (Réduire) et la mise en évidence d'effets métaboliques liés à l'ingestion de jus de fruits fermentés chez le mammifère (Remplacer).

13486 Ce projet de recherche fondamentale d'une durée de quatre ans consiste à tester *in vivo* chez le rat des dispositifs de biopiles à combustible implantables composées d'enzymes couplées à des nanoparticules métalliques. Les biopiles à combustible implantables sont des dispositifs destinés à produire de faibles puissances électriques pour alimenter des microsystèmes médicaux comme des pacemakers, des organes artificiels ou tous types d'implants biomédicaux. Ces systèmes reposent sur l'oxydation de sucres, notamment le glucose, contenus dans l'organisme et sur la réduction de l'oxygène. Ces réactions d'oxydo-réduction sont opérées par des enzymes immobilisées sur des électrodes et génèrent un courant électrique en continu. Ces dispositifs peuvent fournir une source d'énergie biologique innovante pendant une durée théoriquement illimitée, permettant de se passer des piles au lithium classiques. Cependant, ils sont encore limités par une faible durée de vie réelle, et des puissances électriques faibles. L'amélioration de ces dispositifs fait l'objet d'une recherche intense en chimie et en sciences des matériaux. Les procédés innovants sont testés longuement en laboratoire et ceux qui ont fait leurs preuves *in vitro*, par exemple dans des solutions de glucose, sont ensuite testés *in vivo* chez l'animal. Cette étape *in vivo* est indispensable avant d'envisager une éventuelle implantation chez l'homme. Elle permet d'évaluer l'impact du tissu vivant et notamment de ses réactions inflammatoires sur le fonctionnement de la pile. L'effet des mouvements de l'animal sur la durée de vie de la pile doit aussi être évalué, ainsi que l'éventuelle toxicité du dispositif.

Au cours de ce projet, 50 rats mâles et femelles seront implantés avec les modèles de piles les plus prometteurs d'après les campagnes de tests *in vitro* effectués au préalable. Ces dispositifs ont une taille inférieure à une pièce de 10 centimes et pèsent de l'ordre de 2g. Ils sont donc peu invasifs pour un rat adulte d'environ 400g qui devrait les tolérer sans que la procédure ne provoque de souffrance de long terme. Les biopiles seront implantés dans la cavité abdominale des rats sous anesthésie générale et traitement analgésique. L'analgésie sera maintenue au réveil de l'animal et pendant les premières 48h suivant la chirurgie. Le bien-être de l'animal sera évalué quotidiennement. En cas d'infection de l'implant ou de souffrance de l'animal, des traitements analgésiques supplémentaires seront administrés et en dernier recours, l'animal sera euthanasié si un point limite est dépassé. Les biopiles resteront implantées chez l'animal pendant une durée d'au

plus 30 jours et l'expérience sera terminée si la puissance ou la tension aux bornes de la pile est inférieure à 20% de son niveau initial pré-implantatoire.

Réduction du nombre d'animaux : ce projet impliquera 50 rats adultes mâles et femelles. Le nombre d'animaux utilisés au cours du projet est maintenu à un niveau minimal permettant des analyses statistiques nécessaires à l'établissement de conclusions fiables et seuls les modèles de biopiles les plus performants *in vitro* seront testés *in vivo*.

Raffinement du protocole expérimental : les animaux inclus dans ce protocole seront traités contre la douleur avec des analgésiques puissants comme la buprénorphine et carprofène et leur état général sera évalué quotidiennement.

Remplacement par des procédures *in vitro* : Le processus de développement de biopiles dans notre laboratoire passe par une étape préliminaire *in vitro* au cours de laquelle les dispositifs sont testés dans une solution de glucose à 37°C. Le recours à l'animal est ainsi évité dans toute la partie initiale du développement des dispositifs, mais ne peut pas être entièrement remplacé dans l'état actuel de nos connaissances.

13487 Le sepsis est défini comme une réaction systémique en réponse à l'agression d'un micro-organisme qui se manifeste par une atteinte de l'endothélium et des tissus avec pour conséquence l'apparition de défaillances d'organe. Les « Lipoprotéines de haute densité » (HDL) sont des protéines impliquées dans le transport inverse du cholestérol mais possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-apoptotiques, anti-oxydantes et endothélio-protectrices par la diminution de l'expression de molécules d'adhésion. Nous avons montré au cours d'une étude expérimentale précédente que l'injection de HDL reconstituée (CSL111®) permettait de diminuer la mortalité, de diminuer l'orage inflammatoire induite par le choc septique et de neutraliser les bactéries circulantes. Lors d'un choc septique, le poumon étant un organe très fréquemment et précocement atteint, le but de notre étude est d'évaluer si le CSL111® a également un effet protecteur sur le tissu pulmonaire. Les poumons seront prélevés en fin d'études pour analyses. Une première expérimentation sur le modèle de ligature ponction caecale réalisée au sein du laboratoire, a fourni des résultats très intéressants. Cependant nous avons besoin de valider nos résultats sur un autre modèle de sepsis, afin de montrer l'efficacité de nos molécules dans cet autre modèle. De plus, la pneumonie est la première cause de sepsis en réanimation devant l'infection urinaire et la péritonite. Dans ce contexte, il est licite de vérifier si notre thérapeutique est efficace dans le contexte de sepsis pulmonaire expérimental. Le modèle d'injection intra-trachéale de bactéries GRAM négatives (*Pseudomonas Aeruginosa*) permet également de reproduire le phénomène de sepsis chez la souris.

Remplacement : Le sepsis est un syndrome aigu complexe concernant tous les organes qu'il est impossible de modéliser *in vitro*. En effet nous avons besoin de toute la complexité de la réaction inflammatoire d'un organisme vivant pour mimer la pathologie humaine.

Réduction : Les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant de réaliser des études statistiques. Nous utiliserons un maximum de 52 souris C57BL/6J âgées de 10 semaines. Suite à nos recherches bibliographiques, nous avons opté pour cette méthode comparative pour l'induction du sepsis par voie pulmonaire, car elle représente un modèle plus cohérent et reproductible pour assurer l'acheminement des bactéries au niveau des poumons. Cette technique est très simple à exécuter et ne nécessite donc pas d'animaux tests supplémentaires. Ainsi l'utilisation de cette technique nous permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous utilisons 10 animaux par groupe, le modèle entraînant la perte de 30% des animaux.

Raffinement : Durant les procédures chirurgicales, les animaux seront anesthésiés par une injection-intra péritonéale d'un mélange de Kétamine (100mg/kg) et Xylazine (20mg/kg). Elles seront maintenues sur un plateau chauffant (32-35°C) afin d'éviter l'hypothermie. Ce mélange induit une anesthésie rapide et adéquate pendant moins de 30 minutes, soit suffisamment longtemps pour la durée de la chirurgie. Un analgésique sera administré afin de prévenir les douleurs post-opératoires. Les souris seront hébergées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux

sont nourris à volonté et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale. Afin de diminuer le stress des souris durant la manipulation, les souris seront entraînées pour les procédures nécessitant une habituation et pouvant causer un stress.

13488 Les maladies rares congénitales concernent de plus en plus de patients adultes depuis que les progrès de la chirurgie pédiatrique permettent de réparer les malformations au cours des premières semaines de vie des enfants. Les modèles souris de ces pathologies ont déjà apporté une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents aux malformations cardiaques. Notre projet consiste à poursuivre ces efforts en recherchant comment prévenir ces maladies congénitales. Nous nous focaliserons sur 2 pathologies : un syndrome développemental, le syndrome de Cornelia de Lange et une cardiomyopathie dilatée due à une laminopathie, toutes deux montrant des malformations cardiaques.

Les analyses par imagerie à résonance magnétique effectuées chez ces modèles murins nous permettront de mesurer l'impact des malformations sur la fonction du cœur tout en ayant des images précises de morphologie cardiaque. Ces malformations n'ont néanmoins que peu d'impact sur la souris de laboratoire n'ayant pas de demande cardiaque élevée. Chez des patients, beaucoup de ces malformations ont pu et peuvent se révéler subitement au cours d'un effort intense, une situation très différente de celle des souris. Nos modèles de souris permettront donc de comprendre les pathologies sans affecter la qualité de vie des animaux.

Le phénotype des souris n'est donc pas dommageable, les souris ne développent pas non plus d'effet secondaire du type athérosclérose, et leur espérance de vie n'en est pas affectée. Les animaux seront anesthésiés par l'intermédiaire d'un gaz anesthésiant de type isoflurane, pour une analyse pouvant durer jusqu'à 1 heure, ne nécessitant pas d'analgésie, l'imagerie par résonance magnétique étant non invasive et indolore.

Le projet d'analyse par résonances magnétiques se fera dans le respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Pour leur bien-être, nous respecterons la réglementation européenne concernant la densité d'animaux par cage (5 maximum par cage de 1500 cm²). Dans la mesure du possible, les souris seront plusieurs (entre 2 et 5) par cage afin de respecter leur instinct grégaire. Leur milieu sera enrichi par du Sizzle Kraft chaque semaine pour leur permettre de se cacher de la lumière et de les occuper à confectionner leur nid, cela a pour but de réduire leur stress. Les animaux seront observés tous les jours, de leur arrivée à leur mise à mort.

Nous limiterons le nombre de souris par groupe au minimum nécessaire à la significativité statistique, soit 8 par groupe, afin de réduire le nombre de souris dans ce projet. 4 groupes composeront notre étude, 1 groupe contrôle avec des souris à phénotype sauvage, 1 groupe avec les souris haploinsufisantes NIPBL, 1 groupe, avec la mutation de la lamine H222P homozygote et 1 groupe avec la mutation Imna H222P heterozygote. Donc le projet comprendra 32 souris.

13489 Les maladies atopiques, incluant la dermatite atopique (également appelée eczéma), l'asthme, la rhinite allergique et les allergies alimentaires, sont des maladies inflammatoires complexes, impliquant différents sites du corps, avec des caractéristiques communes. Le terme "marche atopique" fait référence à la séquence naturelle des manifestations atopiques, qui montre que la dermatite atopique précède le développement des autres maladies atopiques, et que la sévérité de la dermatite atopique influence le cours de l'allergie respiratoire. Une meilleure compréhension des mécanismes de la marche atopique est cruciale afin de développer des stratégies de prévention et de nouveaux traitements des maladies atopiques.

Nous nous intéressons au rôle de l'environnement dans la peau au cours de la dermatite atopique et comment les molécules produites peuvent influencer le type d'asthme développé plus tard. Pour étudier ces molécules, nous avons mis au point dans notre laboratoire un modèle mimant les caractéristiques de la marche atopique chez la souris. Dans ce modèle, nous utilisons une technologie permettant de générer des micropores dans la peau (technique également utilisée chez l'Homme dans la sphère médicale) puis nous appliquons un allergène (poussières d'acariens) sur la peau de souris. Cette étape engendre une dermatite atopique liée à une réponse immunitaire caractéristique des allergies, et provoque une sensibilisation de la souris aux poussières d'acariens.

Nous avons la possibilité de modifier la profondeur des micropores et donc les molécules produites dans la peau. Deux semaines après le début de la sensibilisation, nous allons réexposer les souris aux poussières d'acariens au niveau des poumons, ce qui va entraîner une réponse allergique similaire à un phénomène asthmatique. Nous caractériserons cette réponse par une analyse de la peau et des poumons, afin de mieux comprendre les mécanismes de la marche atopique. Ce protocole sera également appliqué à des souris génétiquement modifiées pour permettre la caractérisation des différentes cellules et molécules au cours de la marche atopique.

De plus, nous appliquerons ce protocole à deux modèles de souris reproduisant des maladies humaines pour étudier le rôle des molécules précédemment caractérisées dans un environnement plus complexe et déterminer si elles pourraient être des cibles thérapeutiques. Ces modèles pourraient également permettre d'identifier de nouvelles molécules importantes dans la marche atopique.

Remplacement: Les lignées de souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet vont nous permettre d'inactiver certaines cellules ou certains gènes, dont l'implication dans la réponse immunitaire allergique a été suggérée *in vitro* par d'autres équipes de recherche. De plus, les phénomènes à l'oeuvre dans la marche atopique mettent en jeu différents organes (poumons, peau, ganglions) et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires interagissant ensemble. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour confirmer et approfondir ces résultats, pour comprendre les processus responsables de la marche atopique et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 420 souris pour identifier le rôle de différentes molécules dans la marche atopique. L'effectif minimal par groupe est 12 animaux, ce qui permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés, et de conclure quant au rôle des cellules et des signaux cellulaires étudiés dans la marche atopique. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous aurons une phase exploratoire qui permettra de déterminer les 2 conditions optimales parmi un plus grand nombre. Nos expériences se feront ensuite selon les 2 conditions sélectionnées, ce qui permettra de restreindre et cibler les expériences les plus pertinentes et donc de limiter le nombre d'animaux utilisés par la suite.

Raffinement: La rupture de la barrière épidermique par génération de micropores est peu douloureuse, cette méthode est utilisée dans la sphère médicale. L'application topique d'acariens et l'instillation intra-nasale d'acariens nécessitent une anesthésie gazeuse légère et une anesthésie générale légère respectivement. Après ces manipulations, les animaux seront placés sur une plaque chauffante et seront surveillés jusqu'au réveil. Tout au long du protocole, la surveillance des animaux aura lieu tous les 3 jours durant la phase de sensibilisation, et tous les jours durant la phase de réexposition aux acariens au niveau des poumons par instillations intra-nasales. La surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, de sa posture et de son comportement. Si l'animal présente un dos voûté, un pelage hérissé, est inactif après stimulation, ou si les points d'injections présentent des signes d'infection ou d'inflammation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

13490 Depuis plusieurs années, un déclin substantiel d'un grand nombre d'espèces d'oiseaux emblématiques de nos paysages agricoles est avéré avec pour cause principale l'intensification de l'agriculture moderne. L'implication des pesticides suscite actuellement des débats ardents sur leur rôle dans le déclin des populations aviaires. L'effet des produits phytosanitaires sur les oiseaux peut s'exercer de façon directe, à travers son effet toxique sur les individus directement exposés aux molécules chimiques, mais également de façon plus indirecte au travers de la contamination de leur nourriture. Une fois ces molécules toxiques assimilées par les organismes, ils peuvent interagir directement avec les membranes et certains composés cellulaires, limitant ou inhibant divers processus biologiques fondamentaux. Par ailleurs, plusieurs mécanismes endogènes de protection existent pour réduire la concentration des produits phytosanitaires. La détoxification par exemple, consiste à activer certaines enzymes dont la fonction est de métaboliser les produits phytosanitaires en éléments pouvant être éliminés. Toutefois, ce mécanisme s'accompagne d'une production

accrue de radicaux libres pouvant eux-mêmes générer des dommages cellulaires. Ainsi, l'ensemble de ces changements physiologiques pourrait directement nuire aux organismes en augmentant leur taux de mortalité et/ou en impactant négativement leur condition corporelle et leur aptitude à produire des descendants.

A l'heure actuelle, très peu de travaux ont été menés sur l'effet des produits phytosanitaires sur les populations aviaires dans un contexte d'intensification agricole. Les produits phytosanitaires sont aujourd'hui au centre d'enjeux environnementaux considérables. Dès 1999, le ministère de l'Écologie a mis en place le programme de recherche « Évaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des pesticides ». Son objectif était d'apporter une meilleure connaissance des risques liés à l'utilisation des produits phytosanitaires et d'apporter aux décideurs et aux gestionnaires des milieux concernés des références scientifiques pour la définition, la mise en œuvre et l'évaluation des actions publiques en lien avec les produits phytosanitaires. Bien que de nombreux travaux aient été consacrés aux pesticides, il demeure difficile de mettre en évidence de façon formelle, en milieu naturel, les relations de causalité entre l'utilisation de ces substances, l'exposition des organismes et d'éventuels effets écotoxicologiques.

Le projet que je propose ici pour une période de 5 ans s'inscrit précisément dans cet objectif et permettra d'apporter des connaissances sur l'effet des produits phytosanitaires sur des organismes non cibles et d'en évaluer les conséquences démographiques, directes et indirectes. Le modèle d'étude choisi est la perdrix grise car depuis quelques années les populations de cet oiseau emblématique de nos paysages agricoles sont en chute libre. Cette expérience sera réalisée en captivité au sein de volières et aura comme objectif principal de comparer le succès reproducteur des perdrix grises des plaines (*Perdix perdix*) exposées à une alimentation biologique (c'est-à-dire une nourriture exempte de produit phytosanitaire) ou à une alimentation légèrement imprégnée en produits phytosanitaires (une molécule différente sera testée par an selon le même mode opératoire). Chaque année, les oiseaux seront issus d'un élevage et nous testerons 15 mâles et 15 femelles par traitement soit un total de 60 perdrix par an et donc 300 perdrix sur la totalité du projet. Les individus seront suivis périodiquement afin de déterminer leur survie, leur condition corporelle et leur immunocompétence par des mesures descriptives de la qualité de leur système immunitaire. Après cette période d'exposition, nous ferons se reproduire les individus afin d'obtenir leur descendance. Nous suivrons ainsi la qualité de la reproduction en fonction du traitement qu'auront reçu les parents. Le nombre d'œufs pondus, le succès d'éclosion ainsi que la croissance des jeunes seront mesurés.

La règle des trois R a été prise en compte de la façon suivante :

- Remplacement : l'utilisation des animaux vivants est indispensable pour répondre aux questions de ce projet puisque des modèles *in vitro* ne permettraient pas de tester l'effet des pesticides sur la physiologie et le comportement des animaux
- Réduction : l'utilisation de 60 individus par an est un minimum pour disposer d'un échantillon suffisant afin de permettre la réalisation des tests statistiques. Afin de ne pas augmenter le nombre d'individus, nous excluons l'analyse des résultats par des tests statistiques paramétriques car cela aurait conduit à l'augmentation du nombre d'animaux pour atteindre une puissance statistique suffisante.
- Raffinement : il sera réalisé en utilisant des animaux d'élevage ce qui permettra de réduire le stress de la captivité par rapport à des animaux sauvages. Au cours de l'expérience, les oiseaux seront maintenus dans de très bonnes conditions d'élevage. Les couples seront maintenus dans des grands boxes (environ 10 mètres carrés), n'entraînant pas de souffrance, de douleur ou d'angoisse. Dans chaque box, la nourriture et l'eau seront fournies ad libitum. Dans chaque box, des cachettes seront disposées avec des plaques de tôles ondulées. Les animaux seront observés plusieurs fois par jour, pendant 5 minutes, pour repérer des signes de stress ou de douleur en jugeant leur activité, leur locomotion, l'aspect général de leur plumage, le comportement de prostration ainsi que la prise d'eau et de nourriture. Les animaux seront pesés une fois par semaine afin de mesurer leur condition corporelle ce qui nous permettra de juger dans le même temps de leur état général. Si un amaigrissement prononcé (> 10%) ou si un comportement anormal est observé, les animaux seront alors retirés de l'expérience pour être placés dans une infirmerie et

euthanasiés si besoin après consultation de notre vétérinaire référent. A la fin de l'expérience, les animaux en bonne santé seront confiés à un éleveur partenaire du projet. Le projet bénéficiera d'une étroite collaboration avec un vétérinaire permettant ainsi de s'assurer du bien-être animal au cours de cette expérimentation.

13491 Dans un précédent projet, nous avons mis en évidence notre capacité à traiter de manière efficace des tumeurs sous-cutanées dans un modèle murin.

Ce projet avait ainsi permis d'établir une preuve de concept robuste d'un mélange de trois thérapies qui s'est avéré efficace.

Nous proposons maintenant de poursuivre le développement de cette approche avec plusieurs formulations différentes, visant à déterminer les meilleurs dosages et proportions des différents composants.

Nous prévoyons six protocoles successifs afin de pouvoir optimiser la formulation et progresser vers la mise au point d'une thérapie à visée humaine.

Nous allons de nouveau employer un modèle tumoral murin, et greffer des cellules tumorales sur des Souris par injection sous-cutanée.

Nous allons injecter à trois reprises, au même site, les traitements actuellement en développement, avec différentes doses, ainsi que les contrôles permettant de valider les effets.

Nous mesurerons par la suite l'évolution du poids et la taille des tumeurs présentes sur les animaux. Ces données permettront de valider la capacité thérapeutique de nos traitements.

Nous appliquerons des points limites stricts, liés à l'état général des animaux, mais aussi au volume des tumeurs présentes.

Chaque groupe expérimental sera composé de 6 à 10 animaux, selon la méthode d'analyse ciblée (immunologique, effet sur la longévité). Nous utiliserons un maximum de 140 animaux par protocole, cela constituant une cohorte optimale en terme de capacité logistique, tout en mutualisant autant que possible les groupes contrôles.

Remplacement : nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'alternative pour la validation de l'efficacité d'un traitement à stimuler le système immunitaire ou thérapeutique. Nous devons en effet étudier cet effet dans un système complet et compétent.

Réduction : les effectifs de 6 et de 10 animaux par groupe ont été mis en place suite aux études préalables et aux pré-requis statistiques, permettant d'obtenir une réponse statistiquement significative et exploitable, tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés. Nous prévoyons d'utiliser un total de 840 animaux au maximum. Cet effectif maximal théorique correspond à la répétition de 6 protocoles d'optimisation avec 140 animaux.

Raffinement : le modèle tumoral utilisé est décrit dans la littérature et les points limites et la durée de l'étude ont été mis en place en fonction de ces données. Par ailleurs, nous avons mis en place les points limites nécessaires, liés au volume des tumeurs portées par les animaux et à leur masse relative, à l'évolution probable de l'état de santé. Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et pesés 3 fois par semaine. Les tumeurs seront aussi palpées (pour détecter leur présence précoce) puis mesurées trois fois par semaines.

13492 L'efficacité alimentaire est définie comme le rapport entre la quantité d'aliment consommée et la croissance des animaux. C'est un critère essentiel de la rentabilité des élevages de poulets de chair et donc l'un des principaux critères utilisés pour leur sélection génétique. Nous avons mis en évidence dans de précédentes expériences que le métabolome sanguin (ensemble des métabolites présents dans le sang) ainsi que la couleur du sérum sanguin, obtenue par une simple prise de sang, sont liés à cette efficacité et pourraient donc être utilisés comme biomarqueurs de l'efficacité. Pour valider l'utilité de ces caractères en sélection, il nous faut désormais évaluer si ces caractères sont déterminés en partie par la génétique de l'animal. Pour ce faire, nous devons estimer l'héritabilité de la couleur et du métabolome du sérum (proportion de la variabilité du caractère qui

est due à la génétique) et la corrélation génétique entre efficacité et couleur du sérum (part de la génétique qui est commune aux deux caractères).

Pour ce faire, nous proposons de mesurer ces caractères sur 600 poulets de chair, représentatifs des animaux que l'on peut trouver dans les élevages.

Respect de la règle des 3R:

- Remplacer : pour évaluer les possibilités de sélection de l'efficacité au travers de la couleur du sérum chez le poulet, il nous faut disposer de ces mesures et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même

- Réduire : des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaires à cette expérience.

- Raffiner : Le calme et une contention soignée pendant la prise de sang seront mis en oeuvre. Pour le reste, les poulets seront élevés dans des conditions standard, au sol sur copeaux, en groupe et auront accès à l'aliment, l'eau de boisson ad libitum et la possibilité d'explorer des objets divers (billes, bacs à piquer, blocs pour se percher). Ils seront visités deux fois par jour.

13493 Les chevaux athlètes sont classiquement nourris avec beaucoup de céréales qui leur apportent de l'énergie sous forme d'amidon. Or il a été démontré qu'une trop grande quantité d'amidon ingérée pouvait être à l'origine de maladies digestives chez le cheval et d'une baisse de l'absorption intestinale. Au contraire des céréales, la pulpe de betterave est pauvre en amidon, mais riche en fibres solubles. Ces fibres sont fermentées rapidement par les microorganismes du gros intestin du cheval et représentent une source importante d'énergie. La pulpe de betterave semble donc être une matière première très intéressante pour substituer une partie des céréales de la ration du cheval athlète. Pourtant, elle est aujourd'hui peu utilisée en alimentation équine en France. Ceci est dû en partie au manque de connaissance des utilisateurs finaux.

Le présent projet vise à déterminer l'effet de la substitution d'une partie des céréales de la ration par de la pulpe de betterave sur l'écosystème fécal, ainsi que sur les marqueurs de l'inflammation et de l'absorption intestinale.

Les chevaux inclus dans l'étude sont six hongres Trotteur Français adultes répartis en trois groupes de deux individus afin de tester une ration composée de foin et d'orge, une où une partie de l'orge est substituée par de la pulpe de betterave et une composée uniquement de foin. Les chevaux reçoivent donc à tour de rôle trois régimes différents. L'étude est composée de trois périodes de trois semaines, séparée par trois semaines de repos. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque cheval est son propre témoin puisque chaque lot teste les trois régimes dans un ordre différent. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique nécessaire à l'étude. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement. Cela permet de répondre au principe de réduction du nombre d'individus utilisés. Le remplacement de l'équin par un autre modèle animal ou par un essai *in vitro* ne permettrait pas d'obtenir des résultats utilisables chez le cheval athlète.

Les prélèvements nécessaires à l'évaluation des modifications des paramètres de l'écosystème microbien fécal, de l'inflammation et de l'absorption intestinale ont lieu une fois par semaine pendant les périodes expérimentales. Ils sont donc au nombre de trois par période séparés d'une semaine chacun. Ils consistent en une fouille rectale pour obtenir des fèces et en un prélèvement sanguin réalisé via la veine jugulaire. Durant l'essai neuf prélèvements fécaux et sanguins sont donc réalisés par cheval.

Dans une optique de raffinement, les chevaux sont manipulés dans un travail adapté à leur contention pour éviter tout risque de blessure. De plus, pendant les périodes expérimentales les chevaux vont au paddock en groupe et sont exercés quotidiennement au marcheur. Durant les périodes de repos, les chevaux vont au pré en groupe. Ceci permet de respecter leur bien-être. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation.

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

13494 Le but de cette unité d'enseignement (UE) de 2ème année du master Sciences du Vivant Parcours NeuroPhysiologie Appliquée est l'acquisition d'une formation pratique solide en neurosciences et physiologie permettant la mise en œuvre des pratiques que les étudiants ont acquis au cours de l'UE de certification en matière d'expérimentation animale niveau Praticien sur Rongeurs qu'ils ont eu à suivre et valider lors de leur 1ère année de master. Au cours de cette UE, les étudiants auront ainsi à pratiquer sur l'animal dans le respect et la mise en œuvre du cadre réglementaire en matière d'expérimentation animale et à gérer et mettre en œuvre de manière autonome et/ou encadrée par des enseignants chercheurs confirmés en matière d'expérimentation animale deux protocoles expérimentaux comme il est fait dans les laboratoires agréés par les personnels habilités. Le projet mis en œuvre dans cette saisine correspond à des approches expérimentales couramment utilisées dans les laboratoires de recherche en Neurosciences visant à étudier les effets comportementaux en matière de cognition de l'ingestion journalière d'un aliment d'index glycémique haut ou bas ainsi que les effets de ce régime sur le niveau de tolérance au glucose des animaux qui y sont soumis. Le projet consistera à nourrir chaque animal quotidiennement pendant 6 semaines avec une ration de l'aliment ayant un index glycémique haut ou vas représentant 20% de l'apport calorique quotidien et de l'évaluer après 3 semaines de nourrissage au plan de ses performances cognitives lors des 2 semaines suivantes au moyen de 2 tests comportementaux d'apprentissage spatial et sa tolérance au glucose lors de la dernière semaine d'expérimentation en mesurant l'évolution de son taux de glucose dans le sang suite à l'ingestion d'une charge de glucose déterminée. Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal pour réaliser ce type d'expérimentation ne peut pas être substitué par des systèmes virtuels ou cellulaires, le but au niveau du master étant de former les étudiants à la pratique de l'expérimentation animale dans le champ des neurosciences (Remplacement). Le nombre total d'animaux mis en jeu sera de 24 souris par année, nombre estimé nécessaire et suffisant pour permettre l'étude du comportement qui nécessite des groupes d'animaux de taille adéquate afin de réaliser une analyse statistique convenable des résultats (Réduction). Le nombre total d'animaux qui sera utilisé pour ce projet d'une durée de 5 ans sera donc de 120 souris. Pendant les TP, les étudiants certifiés auront à gérer le déroulement et la réalisation du projet et des différentes procédures qui le concernent dans le respect des règles fixées par les contraintes réglementaires et à assurer le bien-être des animaux dont ils seront garants (Raffinement). Les étudiants inscrits dans le master qui ne sont pas certifiés assisteront les étudiants certifiés dans le déroulement et la gestion des procédures sans pour autant intervenir sur les animaux (Raffinement). Enfin, ces TP seront encadrés par les enseignants-chercheurs de l'équipe pédagogique tous certifiés de niveau Concepteur sur Rongeurs et formés aux techniques utilisées. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'élevage contrôlée (température, humidité, cycle jour/nuit inversé) dans des cages adaptées et enrichies. Ils seront surveillés quotidiennement et les points limites mentionnés dans la saisine relative à un état de mal-être persistant relevés (perte de poids corporel supérieure à 10% du poids de départ, perte de poids >20% sur 3 jours, état de stress apparent de l'animal se maintenant suite à la manipulation (maintien d'un comportement agressif, cris récurrents), signes comportementaux anormaux (prostration, hyperactivité, signes d'agressivité vis-à-vis des congénères). Les souris utilisées pour ces TP seront mises à mort à l'issue de la dernière procédure selon une méthode réglementaire.

13495 La dermatite atopique est une maladie de la peau pouvant être associée à d'autres affections telles que l'asthme ou la rhinite allergique. La dermatite atopique, caractérisée par des démangeaisons et de l'eczéma, affecte 10% à 20% des enfants et 1% à 3% des adultes. Les patients présentent une inflammation de la peau et des niveaux d'immunoglobulines dans le sang anormal. Notre laboratoire a mis au point un modèle murin de dermatite atopique, générée par l'application d'un analogue à la vitamine D sur la peau des souris. Grâce à ce modèle, nous avons identifié une cascade d'événements immunologiques qui aboutit à l'initiation de la réponse immunitaire dans les ganglions lymphatiques.

Dans ce projet, nous souhaitons poursuivre l'utilisation de ce modèle murin de dermatite atopique afin de déchiffrer le réseau immunitaire à l'oeuvre dans la réponse induite par l'application cutanée de cet analogue à la vitamine D. D'après nos travaux précédents, et en accord avec la littérature scientifique actuelle, une famille de cellules particulières, les cellules dendritiques, semble particulièrement impliquée dans l'initiation de la réponse immunitaire. Néanmoins, il y a plusieurs sous-types de cellules dans cette famille et le rôle de chacun de ces sous-types est encore mal défini. Nous disposons de lignées de souris génétiquement modifiées qui vont nous permettre d'éliminer spécifiquement certaines de ces cellules, afin de vérifier si l'induction de la maladie est abolie ou retardée chez ces animaux. De plus, de nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées arrivées au laboratoire vont permettre de caractériser la présence de récepteurs à la surface de ces cellules et de les inactiver. Ces récepteurs, ou les cellules qui les expriment, pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans cet objectif, l'analogue sera appliqué au niveau de l'oreille d'animaux génétiquement modifiés tous les deux jours, puis les échantillons seront collectés après 11 jours de traitement, et la réponse immunitaire sera caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire. Nous analyserons l'expression des gènes et les compositions cellulaires au niveau de l'épiderme et du derme de l'oreille, ainsi qu'au niveau des ganglions drainants.

Remplacement: Les cibles (cellules et récepteurs) étudiées dans ce projet ont été identifiées grâce à des travaux menés *in vitro* et *in silico* par notre équipe ou par d'autres laboratoires. Les phénomènes à l'oeuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre cette réponse inflammatoire et confirmer les résultats obtenus précédemment.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 10 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire. Chaque lignée sera constituée de quatre groupes de 6 animaux, pour un total de 240 animaux au maximum. Deux groupes serviront à l'analyse de l'expression des gènes dans les ganglions lymphatiques et au niveau des oreilles des animaux. Ces animaux permettront également d'effectuer une analyse histologique de la peau. Les deux autres groupes seront utilisés pour caractériser les populations de cellules présentes dans ces organes. L'effectif de 24 animaux par lignée est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés. De plus le traitement au niveau de l'oreille droite des souris nous permettra d'utiliser l'oreille gauche en tant que contrôle non traité.

Raffinement: l'administration de l'analogue à la vitamine D se fait par application cutanée, ce qui nécessite une anesthésie gazeuse légère. A partir du jour 9 jusqu'au jour 11 on observe un épaissement et une rougeur des oreilles. Cela peut être accompagné de légères démangeaisons, mais qui ne modifient pas le comportement des souris (toiletage, posture et activités normales). Néanmoins, si une souris présente un dos voûté, un pelage hérissé ou est inactive après stimulation, ou si des lésions au niveau des sites de traitement apparaissent, elle sera retirée de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Certaines lignées nécessiteront l'emploi d'injections intra-péritonéales. Les sites d'injections seront alternés et attentivement surveillés. En cas d'inflammation au niveau d'un site d'injection, l'animal sera retiré de l'étude et bénéficiera de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave, l'animal sera euthanasié immédiatement.

13496 Les arboviroses explosent à travers le monde et représentent un véritable enjeu de Santé Publique. Actuellement plus de 500 arbovirus sont répertoriés et une centaine semble entraîner des manifestations cliniques chez l'Homme. Les arboviroses qui sont en fait des zoonoses entraînent trois grands types de manifestations cliniques : des affections fébriles généralisées (ex: dengue), des fièvres hémorragiques (ex: fièvre jaune) et encéphalites (ex: fièvre de la vallée du Rift). Ces arboviroses sont le résultat de la transmission d'un virus par un vecteur arthropode.

Ainsi, les virus de la Dengue, du Chikungunya et plus récemment du ZIKA sont apparus comme des risques très sérieux quant à la santé humaine. De nombreux composés et substances d'origine

végétale et animale présentent des propriétés antivirales très intéressantes contre les arbovirus (ex: ZIKA). Des données récentes obtenues *in vitro* sur des cellules A549, ont permis d'identifier 6 composés qui présentent une activité antivirale puissante contre le virus ZIKA. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires afin de montrer qu'à leur concentration antivirale effective (démontrée comme non cytotoxique *in vitro*), ces composés n'ont pas d'effet toxique à l'échelle de l'organisme.

Dans ce contexte, il semble indispensable de tester ces composés dans un organisme modèle reconnu dans les études de toxicité, à savoir le poisson zèbre. De par des mécanismes physiologiques fortement conservés au cours de l'évolution, le poisson zèbre présente l'avantage d'être un modèle simplifié et connu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme. C'est notamment un modèle animal reconnu pour des tests de toxicité car il présente un arsenal d'enzymes détoxifiantes comme l'Homme.

Pour ce faire, nous utiliserons des poissons qui seront testés par injection intrapéritonéale avec les composés d'intérêt à leur concentration antivirale effective n'ayant montrée aucune cytotoxicité *in vitro* sur les cellules épithéliales humaines A549.

Ainsi, nous injecterons :

- 5 poissons avec le composé 1 : 1 microg/g de masse corporelle (CC50 *in vitro* 26 microg/mL), MNTC = 20 µg/mL
- 5 poissons avec le composé 2 : 1 microg/g de masse corporelle (CC50 *in vitro* > 100 microg/mL), MNTC > 100 µg/mL
- 5 poissons avec le composé 3 : 5 microg/g de masse corporelle (CC50 *in vitro* > 10 microg/mL), MNTC > 10 µg/mL
- 5 poissons avec le composé 4 : 250 microg/g de masse corporelle (CC50 *in vitro* 400 microg/mL), MNTC = 300 µg/mL
- 5 poissons avec le composé 5 : 125 microg/g de masse corporelle (CC50 *in vitro* 338 microg/mL), MNTC = 250 µg/mL
- 5 poissons avec le composé 6 : 125 microg/g de masse corporelle (CC50 *in vitro* 989 microg/mL), MNTC = 250 µg/mL

Ce protocole pourra être reproduit sur 3 expérimentations indépendantes.

Pour rappel, la CC50 correspond à la concentration entraînant 50 % de mortalité dans la culture cellulaire. Ici les concentrations injectées chez l'animal sont largement en dessous de cette valeur et ne devrait pas entraîner de toxicité.

La MNTC est la dose maximale non toxique sur le modèle cellulaire.

Un nombre total de 90 animaux pourra être utilisé (3 x 5 animaux par condition, x 6 conditions). Néanmoins, si les données statistiques sont suffisantes, ce nombre sera fortement diminué.

Cette étude répond à la règle des 3R :

Remplacement : Des tests *in vitro* ont déjà été réalisés afin de déterminer la toxicité de ces composés. L'étude menée ici se place à des concentrations montrées comme non toxiques sur les cellules A549, concentrations qui présentent de surcroît un effet antiviral. Il semble indispensable de passer au modèle animal pour nous assurer de la non toxicité de ces composés. Le poisson un modèle pertinent utilisé par la communauté scientifique pour la compréhension de divers processus physiologiques et pathologiques.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (Student / Anova). La segmentation des expérimentations (X3 expériences indépendantes) permettra d'arrêter l'étude si une toxicité insoupçonnée se présentait, ou bien si les données statistiques étaient suffisantes.

Raffinement : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28.5°C ; oxygénation). Les animaux seront nourris plusieurs fois par jour et surveillés quant à leur comportement. Les animaux seront observés plusieurs fois par jour et tout sera mis en

œuvre pour réduire la douleur (anesthésie, analgésie, points limites) si des signes de souffrance sont observés.

13497 L'infarctus du myocarde est l'une des principales causes de décès dans les pays industrialisés, et nécessite une prise en charge précoce pour réduire la perte de la fonction cardiaque. Dans le cas de l'infarctus du myocarde, le manque d'apports nutritifs engendré par l'obstruction d'un vaisseau du cœur va conduire à une perturbation du métabolisme qui à terme se traduira par une perte de la fonction contractile cardiaque.

Dans l'organisme, il existe un lien étroit entre la circulation sanguine et le métabolisme du glucose. Nous souhaitons étudier la rupture de ce lien survenant lors de ce processus pathologique. Jusqu'à présent aucune étude n'a suivi l'évolution du métabolisme du glucose combiné à la fonction contractile et tissulaire au moment où se produit l'infarctus du myocarde.

Ce projet de recherche vise, d'une part, à caractériser le lien entre la microcirculation et le métabolisme glucidique lors de l'infarctus du myocarde par un système hybride d'imagerie du vivant médicale simultanée.

Seule l'expérimentation *in vivo* chez des animaux permet de reproduire fidèlement la physiopathologie de l'infarctus du myocarde. Ces nouvelles explorations fonctionnelles vont permettre de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs. Le suivi non invasif et sur du long terme des animaux s'inscrit dans une optique de réduction du nombre d'animaux puisque l'animal sera son propre témoin.

Pour éviter toute souffrance, le modèle animal est induit chirurgicalement sous anesthésie générale par ligature définitive ou transitoire de la coronaire, sur deux espèces : un modèle souris mâle C57BL/6J et un modèle rat Wistar femelle. Il est nécessaire de travailler sur ces deux espèces, parce que la technique d'imagerie développée par le laboratoire est optimisée chez le rat. De ce fait, il s'agirait dans un premier temps de caractériser le lien entre la microcirculation et le métabolisme glucidique chez ce modèle avant d'optimiser la technique chez la souris qui est le modèle le plus utilisé pour étudier la physiopathologie de l'infarctus cardiaque.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en respectant les règles de statistique. Au total 120 animaux seront étudiés pour ce projet pour une période de 3 ans : 60 rats et 60 souris.

Les animaux seront suivis par imageries au moment de la ligature de la coronaire (J0) afin d'observer les phénomènes précoces de l'obstruction de l'artère, puis à J1, J3, J7, J14 et à 1 mois. Ce suivi se fera avec deux modalités d'imageries médicales : la scintigraphie afin d'observer la captation du glucose par le cœur et une méthode d'échographie ultrarapide et d'échocardiographie haute résolution afin de caractériser la fonction et vascularisation cardiaques.

Le comportement des animaux sera surveillé quotidiennement afin de détecter tous signes éventuels de douleurs. L'administration d'un analgésique adapté sera prévue. En cas de non-récupération de l'animal, une mise à mort anticipée sera pratiquée.

A terme ce projet permettra de valider ces deux méthodes d'imageries pour une utilisation en recherche clinique et de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs.

13498 Les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD) sont les maladies hépatiques les plus fréquentes dans les pays industrialisés, associées à l'obésité et au diabète de type 2. La stéatose se caractérise par une accumulation de graisses dans les cellules du foie (les hépatocytes). Bien que souvent asymptomatique, cette accumulation peut entraîner une réponse inflammatoire appelée stéato-hépatite non alcoolique (NASH) qui favorise l'apparition d'une cirrhose et dans certains cas le développement d'un cancer du foie (hépatocarcinome ou CHC). La présence de stéatose est rapportée sur environ 20 à 30% des biopsies hépatiques réalisées dans la population générale, et celles de la NASH dans 2 à 3 %. La définition correspond à des lésions, comparables à celles objectivées lors des intoxications alcooliques chroniques, en l'absence de prise significative d'alcool (> 20 à 30 g/j chez l'homme, > 20 g/j chez la femme), ou d'association à d'autres maladies hépatiques chroniques (virales ou toxiques). Les lésions de stéatose sont classiquement notées

chez la majorité des malades obèses (60 à 75%), diabétiques (21 à 78%) et avec un taux élevé de lipides dans le sang (50 %). Les lésions de NASH sont objectivées chez environ 20% des malades obèses. Cependant les lésions de NASH peuvent également être notées chez des malades sans surpoids (3%), ni diabète patent. Ces lésions vont de la simple stéatose qui possède une évolution bénigne, à des lésions de stéato-hépatites dites évolutives et qui sont responsables de l'apparition d'une fibrose hépatique et de véritable cirrhose pouvant se compliquer en cancer du foie. La NASH n'est pas le résultat d'une lésion en particulier, mais plutôt la « co-existence » de plusieurs lésions incluant une stéatose, une dégénérescence des cellules du foie et des infiltrations de cellules inflammatoires dans le foie. Les mécanismes conduisant au développement de la NASH n'ont, à ce jour, pas été formellement élucidés et l'hypothèse d'une pathologie multifactorielle reste la plus probable. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la NASH est devenue un enjeu majeur de santé publique. Il a été montré que l'augmentation de l'expression du récepteur TREM-1 au niveau des cellules inflammatoires dans le foie était corrélée à la sévérité de l'inflammation de la NASH et par conséquent, son inhibition pourrait être une nouvelle approche thérapeutique.

Ce travail fait suite à un projet démarré depuis 2018 et pour lequel nous avons obtenu des résultats encourageants qui montrent effectivement que le peptide antagoniste de TREM réduit significativement la fibrose, consécutive à l'apparition de la NASH elle-même induite par un régime alimentaire spécifique. Cependant, nous souhaitons répéter le même protocole de 2019 pour pouvoir étudier la réapparition des différentes ILCs intra-hépatiques ou cellules lymphoïdes innées, une composante du système immunitaire qui contribue à la réponse immunitaire rapide, en analysant le foie entier par cytométrie en flux.

Dans cette étude, nous voulons donc évaluer le potentiel thérapeutique d'un peptide inhibiteur de TREM-1 pour le traitement de la NASH chez la souris. Pour cela, nous souhaitons utiliser un organisme vivant pour tester le(s) effet(s) du peptide sur les différents symptômes que représente la NASH. A ce jour, la souris reste le meilleur modèle représentatif de la NASH rencontré chez l'homme et ainsi les résultats de cette étude pourraient représenter les premiers éléments du développement d'une nouvelle thérapie pour la NASH chez les patients.

1. Remplacement : Il n'existe aucune approche *in vitro* qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement d'une pathologie inflammatoire chronique multifactorielle comme la NASH. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de TREM-1 sur l'ensemble des paramètres (système immunitaire, microbiote intestinal, etc...) contribuant au développement de la NASH et évaluer réellement le potentiel thérapeutique du peptide.

2. Réduction : l'étude sera réalisée avec un nombre total de 72 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Chaque groupe comportera 8 animaux : un nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux.

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. La pathologie (NASH) sera induite par l'administration d'un régime alimentaire carencé en méthionine et choline durant 6 semaines. Cette méthodologie est fréquemment utilisée pour induire une NASH expérimentale représentative de celle observée chez l'homme. Le traitement thérapeutique sera réalisé par injection intra-péritonéale quotidienne du peptide durant 2 semaines par un personnel technique qualifié. Le peptide utilisé a déjà montré ses effets bénéfiques dans le traitement d'autres pathologies comme le choc septique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Par ailleurs, une procédure d'estimation (avec des paramètres définis) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements d'organes seront effectués pour permettre de réaliser les analyses biochimiques.

13499 La toxoplasmose est une parasitose dont la prévalence chez l'Homme, en France, est d'environ 40% dans la population générale. Il s'agit dans plus de 80% des cas d'une infection asymptomatique et bénigne. Plus rarement, cette infection peut revêtir un caractère de gravité, et un traitement médicamenteux peut être mis en place pour limiter les conséquences de la toxoplasmose. Ainsi, chez la femme enceinte, contexte dans lequel s'effectue ce projet, l'infection par ce parasite peut être responsable d'une toxoplasmose congénitale par atteinte du fœtus (transmission transplacentaire). La gravité de celle-ci est d'autant plus importante que l'infection survient précocement au cours de la grossesse. Le diagnostic de toxoplasmose congénitale réalisé à la naissance, repose sur la sérologie et l'analyse du placenta et du sang de cordon/sang de bébé. Le diagnostic de la toxoplasmose congénitale reste limité aux laboratoires spécialisés. Il nécessite dans le cas particulier du diagnostic prénatal (DPN), un agrément délivré par l'Agence de la Biomédecine. Seule l'identification formelle du parasite dans ces liquides biologiques, par biologie moléculaire (détection de l'ADN du parasite par PCR) et/ou par inoculation à la souris permettra de confirmer le diagnostic de toxoplasmose congénitale. Cette dernière constitue la méthode de référence, permettant également l'isolement de la souche du parasite, indispensable pour les études épidémiologiques. Le modèle murin, sensible à l'infection par le toxoplasme (parasite des animaux à sang chaud) est donc approprié et le seul disponible, il n'y a pas d'alternative *in vitro*. Dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose, l'expérimentation repose sur l'inoculation par voie intrapéritonéale à la souris, d'échantillons biologiques d'origine humaine issus de patients à risque de toxoplasmose congénitale (liquide amniotique, placenta ou sang de cordon/bébé). Dans le cadre de la recherche pour l'isolement et la collection des souches de toxoplasmes en vue de leur caractérisation phénotypique et génotypique, d'autres échantillons peuvent être inoculés. Le nombre de souris utilisées pour l'expérimentation est de 2 à 6 souris (lié à la nature et à la quantité d'échantillon biologique disponible). Une fois inoculées, les souris sont surveillées quotidiennement. L'infection par le toxoplasme, bénigne pour l'animal, sera affirmée par l'apparition d'anticorps spécifiques anti-Toxoplasmes, détectés sur une goutte de sang prélevée au niveau de la veine de la queue, un mois après inoculation. Dans de rares cas, l'infection peut être suspectée sur des signes d'infection précoce (poils hérissés, gonflement de l'abdomen). En cas de signes cliniques limites, 72h après l'inoculation, (fourrures ébouriffées, dos voûté) laissant supposer une atteinte toxoplasmique, un traitement anti-toxoplasmique sera institué ad libidum. La sulfadiazine permet une amélioration des signes cliniques les jours suivants. Tous les animaux (positifs ou négatifs pour la toxoplasmose) issus de l'expérimentation, font l'objet d'une euthanasie. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est d'environ 1200 souris par an en fonction du nombre de prélèvements à analyser. Enfin les souris sont surveillées quotidiennement et sont hébergées dans des cages de dimensions adaptées avec un enrichissement adéquat. Le bien-être animal sera vérifié par contrôle visuel (feuille d'observation). Une attention particulière sera portée entre le jour de l'inoculation et 72 heures après (personnels du laboratoire et/ou animaliers). A partir de J3 et jusqu'à la fin de la procédure, une surveillance journalière est instaurée. Changement de litière régulière et mise à disposition de nourriture, eau ad libidum, et présence de bandes de papier dans les cages comme raffinement.

13500 L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, chronique, et fortement invalidante. Elle expose les millions de patients atteints à une limitation de la vie quotidienne et à des ré-hospitalisations fréquentes. En dehors de l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque peut aussi se développer dans le cadre du vieillissement souvent associé à l'hypertension artérielle. Cette forme d'insuffisance cardiaque est caractérisée par une croissance du muscle cardiaque (dite hypertrophie) qui devient plus rigide et plus fibreux. Les traitements actuels luttent contre les symptômes de l'insuffisance cardiaque mais il n'existe pas de traitement permettant d'améliorer directement la constitution du muscle cardiaque, en limitant notamment le développement de la fibrose cardiaque.

Ce projet cherche à mieux comprendre les mécanismes contribuant au développement de la fibrose cardiaque aux dépens du muscle cardiaque et ainsi à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques

afin d'éviter ou de retarder les complications cardiaques liées à la fibrose cardiaque et donc le développement de l'insuffisance cardiaque dans le contexte de l'hypertrophie cardiaque.

Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes cardiaques pathologiques et de tester de nouveaux principes thérapeutiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modèles cellulaires ne peuvent refléter la complexité de la pathologie humaine. Les modèles chez la souris restent donc les meilleurs pour étudier ces processus.

La souris est un modèle de choix pour l'étude de l'hypertrophie du myocarde et de sa transition vers l'insuffisance cardiaque. En réponse à une augmentation du niveau de pression artérielle, le cœur de la souris développe en effet des modifications de sa structure et de son contenu qui sont très proches de celles observées chez l'homme. Il existe notamment une croissance de la masse musculaire associée à un développement de la fibrose cardiaque, mécanisme étudié dans ce projet. De plus, la fonction cardiaque peut être mesurée par des techniques d'imagerie non-invasives qui permettent de bien caractériser le développement de la fibrose cardiaque.

Le nombre total de souris nécessaires à la réalisation de ce projet est de 630 pour une durée de 4 ans. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. La taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats a été calculée grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales, l'administration de nouveaux traitements à action anti-fibrosante, et une évaluation de la fonction et de la structure cardiaque à l'aide d'examens d'imagerie.

Pour éviter toute souffrance, toutes les procédures de chirurgie sont réalisées sous anesthésie générale. Des traitements antalgiques sont utilisés afin de réduire au maximum la souffrance animale. Une grille d'évaluation des points limites est mise en place et utilisée pour activer les mesures d'accompagnement améliorant le bien-être de l'animal. Tout signe de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'identifier une nouvelle cible thérapeutique limitant le développement de la fibrose cardiaque. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouveaux traitements adaptés pour des millions de patients souffrant d'insuffisance cardiaque, notamment les patients les plus âgés.

13501 Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les déficiences auditives (perte auditive et acouphènes) toucheraient aujourd'hui 15% de la population mondiale. L'impact sociétal est majeur, et peut entraîner chez les malades, isolement social et dépression. Ce projet permet de vérifier l'efficacité de candidats médicaments grâce aux modèles précliniques de perte d'audition et d'acouphènes. Les acouphènes sont des sensations auditives (sifflement, grésillement, bourdonnement) qui ne sont pas causées par un bruit extérieur. Elles apparaissent suite à l'exposition à un bruit de forte intensité (ou comme effet secondaire de certains médicaments) et peuvent être permanentes. A ce jour, il n'y a pas de médicament dans le traitement de la perte d'audition. Ceci justifie le besoin important de développer la recherche dans ce domaine. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet qui consiste à générer chez le rongeur (rat, souris) et le cobaye une perte d'audition et/ou des acouphènes pour vérifier l'efficacité des principes actifs. Les pertes auditives et les acouphènes seront induits chez les animaux via les mêmes mécanismes que ceux retrouvés chez l'homme. Les mécanismes sont les effets secondaires de certains médicaments, les traumatismes sonores (bruit intense pendant une longue durée) et le vieillissement. Nous proposons à nos clients (de sociétés pharmaceutiques) un panel de modèles afin de tester l'efficacité de nouveaux traitements pour soigner les troubles de l'audition. Les cellules de l'oreille interne permettant de percevoir les sons n'ont pas la capacité de se régénérer et certains phénomènes conduisent à leur destruction ou à d'autres atteintes du système auditif. Les troubles auditifs vont être créés chez l'animal de trois façons différentes : administration de molécules, exposition à un bruit puissant et utilisation de modèles de souris présentant des pertes auditives précoces liées au vieillissement. Sur ces animaux des traitements seront testés pour évaluer les potentiels protecteurs et/ou régénérateurs.

En particulier des mesures de l'audition seront réalisées sur des animaux anesthésiés à l'aide de techniques similaires à celles utilisées chez l'homme. Ce projet comprend au maximum 22430 animaux sur 5 années. Les animaux inclus dans ce projet vont donc développer des troubles de l'audition. Nous espérons grâce à ce projet permettre la poursuite du développement des traitements ayant démontré une efficacité sur les animaux présentant des troubles auditifs. Toutes les procédures sont réalisées par du personnel formé et compétent et conformément aux recommandations internes.

La prise en compte des 3R se fait de la façon suivante :

Remplacer : le recours à l'animal de laboratoire est nécessaire car il n'existe pas de méthodes alternatives validées pour mesurer l'activité auditive et pour développer des modèles pathologiques de trauma acoustique, d'acouphènes et de vieillissement de l'appareil auditif. Les atteintes des cellules ne peuvent pas être étudiées via la culture cellulaire ou les modèles informatiques car nous ne pouvons pas reproduire la complexité des mécanismes conduisant aux troubles de l'audition. Néanmoins nous réalisons une veille bibliographique active afin de suivre les modèles de remplacement qui sont susceptibles d'être développés à l'avenir.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été calculé, selon des méthodes de biostatistique, en tenant compte de la variabilité des modèles et des méthodes d'induction des troubles auditifs. Ce nombre d'animaux nous permettra d'avoir des résultats fiables sans utiliser plus d'animaux que nécessaire. La réutilisation d'animaux (pour la formation et le maintien des compétences) s'effectue dans le cadre de nos procédures internes et après approbation par un vétérinaire.

Raffinement : Le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée. Mais aussi la prévention de toute douleur, détresse ou inconfort chez l'animal.

13502 Les maladies rétinienne, cause majeure de perte de la vision à travers le monde, sont caractérisées principalement par une dégénérescence des photorécepteurs. Aujourd'hui, elles restent malheureusement incurables. Notre objectif à long terme est de contribuer aux avancées scientifiques permettant le développement d'approches thérapeutiques innovantes chez les patients atteints de maladies dégénératives de la rétine. L'une des stratégies choisies vise à revitaliser la capacité de régénération de la rétine qui est naturellement extrêmement limitée chez les mammifères. Au contraire, chez les poissons ou les amphibiens, différentes populations de cellules souches contribuent efficacement à la réparation de la rétine après lésion. Notre approche consiste donc à étudier les voies de signalisation contrôlant les processus régénératifs chez le xénope, un amphibien pourvu de capacités régénératives naturelles. L'objectif est d'identifier les facteurs clés qui permettraient de stimuler la prolifération et le potentiel neurogénique des cellules souches rétinienne dormantes des mammifères.

Il est essentiel d'établir en premier lieu un modèle de dégénérescence des photorécepteurs chez le xénope mimant les pathologies neurodégénératives de la rétine humaine. C'est dans ce cadre que nous souhaitons mettre au point un modèle de dégénérescence des photorécepteurs chez le xénope, par injection intra rétinienne de Chlorure de Cobalt (CoCl₂). Puis dans un second temps, nous étudierons les mécanismes de régénération.

Les phénotypes de dégénérescence rétinienne concernent un organe non-vital qui régénère entièrement chez l'espèce concernée. D'autre part, la déficience visuelle consécutive à une dégénérescence cellulaire, comme dans la DMLA, est indolore. Cependant, comme notre protocole implique des injections intraoculaires, le niveau de sévérité attendu est de classe modérée.

Nous prévoyons d'utiliser 691 animaux (11 adultes et 680 têtards) pendant la durée de 2 ans du projet.

Conformité avec les exigences 3R :

-Remplacer : Il n'existe pas d'alternative *in vitro* car le processus de régénération étudié va fortement dépendre de l'environnement cellulaire *in vivo*.

-Réduction : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse au traitement.

-Raffiner : Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter la douleur induite par l'injection intra-oculaire. Les points limites sont appliqués dans le respect du bien-être animal, afin de limiter au maximum leur souffrance.

13503 Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie de produits vétérinaires canins chez le chien.

Pour le développement d'un produit vétérinaire, les différentes formulations candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui est la plus adaptée pour le traitement de l'animal.

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation, 3 à 12 chiens seront traités à la posologie recommandée par le fabricant et les volumes administrés ne dépasseront pas les recommandations du Gircor. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque chien pourra recevoir séquentiellement chacune des formulations. Entre chaque test, des périodes de repos suffisantes seront respectées.

La pharmacocinétique ou la pharmacodynamie reposera sur des prélèvements sanguins, et/ou tout autre prélèvement non invasif tel que la récolte de fèces, le prélèvement de sperme, de salive, d'urine...La fréquence et le volume des prélèvements seront déterminés en fonction du respect du bien-être et de la santé des animaux, et respecteront les recommandations du Gircor.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 270 chiens, ce nombre pouvant être diminué par la réutilisation des animaux.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

13504 Les plaquettes sanguines jouent un rôle clé dans l'arrêt du saignement. Suite à une lésion vasculaire elles adhèrent à la paroi lésée pour former un clou hémostatique qui stoppe les saignements. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ont été clairement identifiés.

Les plaquettes participent également au maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation dans des organes tels que la peau, le poumon ou le cerveau. Ceci a été démontré par le fait que l'absence de plaquettes (thrombopénie) induit des saignements au niveau d'un site présentant une inflammation. A ce jour, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent obscurs et il a été proposé que ces mécanismes diffèrent de ceux de l'hémostase primaire, impliquée dans l'arrêt des saignements suite à une lésion vasculaire.

Comprendre le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire et dans l'arrêt du saignement au niveau du site inflammatoire peut avoir des applications pour soigner des patients qui présentent des saignements lors d'une inflammation.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance de deux des plus importants récepteurs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) plaquettaires impliqués dans l'inhibition de l'activation des plaquettes ainsi que l'importance de la sécrétion des granules plaquettaires dans le maintien de l'intégrité vasculaire en conditions inflammatoires. Pour cela des animaux seront soumis à trois modèles d'inflammation cutanée locale : la dermatite irritante de contact induite par l'application d'huile de croton, la réaction antigène – anticorps appelée phénomène d'Arthus et la chambre d'observation dorsale permettant de faire de l'imagerie intravitale également basée sur une réaction antigène – anticorps.

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle des récepteurs ITIM plaquettaires et de la sécrétion des granules plaquettaires dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors de réactions inflammatoires.

L'inflammation cutanée (la dermatite irritante de contact, le phénomène d'Arthus et les chambres d'observation dorsale) concerne essentiellement les vaisseaux sanguins, les membranes séreuses (thorax, abdomen, plèvre), le péricarde et la membrane synoviale. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par ces phénomènes intégrés.

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement

Le stress et la douleur des animaux utilisés dans ce projet seront réduits au maximum :

- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de l'anesthésie afin de lutter contre l'hypothermie
- Anesthésie de l'animal pour toute procédure susceptible d'induire une douleur
- Injection d'analgésique pendant et après chaque procédure chirurgicale

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 608 souris.

13505 Introduction

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est devenue l'une des priorités de santé publique en raison du risque élevé de complications cardiovasculaires associées à l'insuffisance rénale au stade terminal. Des études épidémiologiques récentes ont montré que la néphropathie chronique était un facteur de risque cardiovasculaire indépendant des facteurs classiques, tels que l'hypertension, la dyslipidémie et le diabète. Les mécanismes responsables du risque cardiovasculaire accru associé aux IRC ne sont pas connus et constituent l'un des domaines de recherche les plus actifs et représentent l'un des plus grands défis de la médecine moderne.

Objectif

Dans la présente étude, nous avons identifié deux gènes différentiellement exprimés dans des échantillons de sang total de patients atteints de néphropathie chronique et souffrant d'athérosclérose. Nous avons sélectionné ces candidats, le miR-23a-5p et le BTLA, comme candidats potentiels pour étudier son rôle dans l'athérosclérose accélérée induite par l'IRC.

Nous utiliserons un modèle d'athérosclérose chez la souris (souris ApoE KO sous nourriture hypercholestérolémique), associé à une néphrectomie sub-totale comme modèle d'insuffisance rénale. Ceci permettra de valider *in vivo* des cibles thérapeutiques potentielles, suggérées par les études *in vitro* / *in silico*.

En effet, l'athérosclérose associée à l'insuffisance rénale chronique est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, résumant l'ensemble des interactions entre les organes, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans cette double pathologie. La souris est un modèle de choix car il est possible d'y induire des lésions athéromateuses dont la physiopathologie est proche de celles de l'homme. Nous avons identifié une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'athérosclérose. Cette cible peut être modulée par un traitement que nous allons tester chez la souris.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Les procédures chirurgicales de néphrectomie seront réalisées sous anesthésie gazeuse avec une analgésie pré et post-opératoire. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 1 an. Le nombre de souris utilisées sera de 100 au maximum.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions athéromateuses. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou de freiner le développement de l'athérosclérose chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique.

13506 La schizophrénie ou trouble dissociatif de l'identité est un trouble mental sévère et chronique appartenant à la classe des troubles psychotiques. Ce trouble apparaît généralement au début de l'âge adulte (entre environ 15 et 30 ans). Sa prévalence est de 0,4 %, et la probabilité qu'un individu particulier développe le trouble au moins une fois dans sa vie est de 0,7%. Ses manifestations cliniques sont très hétérogènes avec des formes d'altération des processus sensoriels (hallucinations) et du fonctionnement de la pensée (idées obsédantes, délire, ...), ainsi que des altérations du fonctionnement cognitif et affectif.

Le traitement médicamenteux de la schizophrénie est centré sur la prise de médicaments antipsychotiques (ou neuroleptiques) qui préviennent les phases aiguës ou diminuent l'intensité des symptômes. Certaines schizophrénies sont résistantes aux antipsychotiques classiques et nécessitent l'utilisation de molécules antipsychotiques dites de deuxième intention, telle que la loxapine, qui peut cependant présenter des effets indésirables à forte dose.

Ce projet de recherche fondamentale d'une durée maximale de 5 ans et de gravité légère nécessitant l'utilisation de 60 rats sains, vise à étudier le mécanisme d'action de cette molécule administrée à trois doses croissantes par Tomographie par Émission de Positons (TEP) à l'aide de trois radiotraceurs de la neurotransmission. L'utilisation de doses croissantes devrait permettre de comprendre les causes des effets indésirables observés à forte dose.

L'utilisation de trois radiotraceurs permettra une étude globale des différents mécanismes mis en jeu au sein du cerveau. En parallèle, des examens d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) anatomiques longitudinaux seront réalisés pour valider l'absence de modification cérébrale trop importante au fil du temps.

Dans la mesure où notre projet consiste à étudier les mécanismes d'action d'effets secondaires d'un médicament sur le cerveau, il n'est pas possible de travailler sur des préparations *in vitro*.

Nous n'attendons pas de dommages physiques sur nos animaux. Les administrations de loxapine ne seront qu'en aigu et non en chronique. Aux plus fortes doses, les effets secondaires possibles chez l'animal pourront être une léthargie liée à une somnolence. La molécule testée est un médicament disposant d'une autorisation de mise sur le marché chez l'Homme et dont la posologie est connue chez le rat. Elle sera administrée chez des animaux sains. L'imagerie TEP sera réalisée sous anesthésie gazeuse à une fréquence maximale d'un examen par semaine sur une durée maximale de deux mois.

A la fin de l'étude, après une période de récupération permettant l'élimination totale du médicament, les animaux seront proposés au reclassement interne de l'animalerie, pouvant ainsi être utilisés dans d'autres projets de gravité légère, modérée ou sans réveil.

13507 Les maladies du système nerveux central (SNC) sont devenues au 21^{ème} siècle la première cause mondiale de handicap, avec souvent des besoins médicaux qui restent très insatisfaits. Ces manques médicaux et thérapeutiques laissent de très nombreuses pathologies, lésions, accidents vasculaires cérébraux sans aucun traitement curatif, voire même palliatif. Ainsi, avec le vieillissement de la population, des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer deviennent des préoccupations majeures et donc un réel enjeu de santé publique.

Les recherches actuelles ont augmenté leurs efforts ces dernières années, suscitant de grands espoirs pour les patients malades et leurs familles. Cette demande de projet s'inscrit dans cette dynamique avec pour objectif d'apporter des solutions pour améliorer les perspectives thérapeutiques.

De récents travaux scientifiques se sont focalisés sur la compréhension des mécanismes d'apparition et de détections de ces maladies ou cancers, améliorant la précocité des diagnostics et les chances de succès face à la maladie.

Il existe des barrières physiologiques du corps humain qui limitent considérablement les possibilités de traitements et constituent de réels challenges thérapeutiques. Le cerveau présente ce type de réseau vasculaire au niveau du SNC, il assure les échanges constants entre le compartiment sanguin et le parenchyme nerveux. Ces échanges sont finement régulés et très sélectifs, d'où le nom de barrière hémato-encéphalique (BHE). Son rôle est d'assurer l'apport d'éléments essentiels

au bon fonctionnement du cerveau (glucose, lipides, acides gras, vitamines, protéines), mais aussi sa protection. Cette barrière bloque à la fois, les agressions pathogènes et toxiques provoquées par les bactéries, virus ou micro-organismes, ainsi que le passage de molécules non-spécifiques tels que certains médicaments.

La connaissance des mécanismes et acteurs de cette barrière est devenue un réel challenge pour la communauté scientifique, d'autant que de nombreux traitements sont abandonnés par manque de passage efficace. La stratégie sera de faciliter ce passage de biomolécules.

Par le développement de molécule-vecteurs, on améliore la biodisponibilité et le passage d'agents thérapeutiques vers le cerveau. Grâce à la reconnaissance spécifique d'un partenaire ou d'un récepteur, le complexe vecteur-médicament pourra franchir cette barrière et agir dans le parenchyme (SNC). D'autres voies de passage et stratégies ont également été envisagées. Le Liquide céphalorachidien (LCR) est un fluide stérile qui entoure, protège et irrigue l'ensemble du SNC. Cette voie, peu étudiée jusqu'alors, n'est pas soumise à la sélection « récepteur dépendant » pour valider directement nos vecteur-médicaments. De plus, utiliser le LCR comme nouvelle alternative à la BHE pourrait améliorer le potentiel d'adressage au cerveau, permettre une médication optimisée par rapport à l'intraveineux (doses revues à la baisse) et d'envisager des traitements moins lourds pour les patients.

Dans ce cadre technologique, notre société et son partenaire académique se sont regroupés au sein d'un Laboratoire Commun de Recherche pour le développement de vecteur-médicaments. Ces molécules sont destinées aux traitements de pathologies centrales comme la maladie d'Alzheimer. Certains de ces conjugués sont développés dans le cadre de partenariats académiques ou industriels.

Pour mener à bien notre modèle préclinique, nous envisageons après validation *in vitro* de réaliser des expériences sur le petit animal de laboratoire, ici la souris.

Ce projet comportera deux procédures pour une durée de 5 ans :

Procédure 1: Valider les conjugués vecteur-médicaments au niveau central, *in situ* (parenchyme central) ou par la voie méningée (LCR).

Nos Vecteur-médicaments, préalablement sélectionnés et produits, sont testés de manière à valider leurs effets pharmacologiques au niveau central chez le rongeur. Pour cette partie, nous envisageons d'utiliser un nombre maximum de 1800 souris sur 5 ans, calculé sur la base d'un total de 36 animaux par conjugué, 6 groupes de 6 individus, (groupes tests ou effet dose, contrôle négatif). Ce n de 6 correspond au nombre nécessaire pour encadrer et valider l'effet pharmacologique d'un conjugué (cf. 3. 3. 5 « Approche statistique utilisée »), en tenant aussi compte de la variabilité physiologique entre individus. A raison d'une dizaine de conjugués par an, l'estimation arrive à 360 souris/an et 1800 souris/5ans.

Procédure 2: Utiliser l'approche LCR comme nouvelle stratégie d'adressage au niveau central, de traitement ou de suivi (dosage marqueurs ; imagerie) des pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Annexe II)

Pour cette partie, nous utiliserons un nombre maximal de 1200 souris (modèle pathologique Alzheimer et contrôle sain dit « Wild Type ») sur 5 ans, calculé sur la base d'un total de 24 souris par conjugué, réparties en 4 groupes de 6 individus (1 groupe test et contrôle par lignée, Alzheimer et WT), ce nombre doit permettre de valider un effet significatif du vecteur-médicament sur ce modèle pathologique correspondant. Au total, nous utiliserons au maximum 240 animaux/an et donc 1200 souris/5ans.

Pour cette demande d'une durée de 5 ans, nous envisageons donc d'utiliser au maximum : 1800 animaux (procédure 1), 1200 (procédure 2), soit un total de 3000 souris.

Au cours de ces 2 procédures, le responsable de projet s'assurera du bien-être animal et notamment de sa conformité avec la règle des « 3 R » (ANNEXE I). Toutes les procédures pouvant générer de l'inconfort et/ou de la douleur aux animaux, sont soumises à un protocole anesthésique et analgésique rigoureux qui comporte une anesthésie générale volatile (Isoflurane) ou fixe (Kétamine-Xylazine) associée à une anesthésie locale (lidocaïne) des analgésiques (paracétamol

et buprénorphine). Ajouté à cela un hébergement optimal (T°C, cycle lumière 12h/12h..), du suivi global et bien être (nombre d'individus par cage, absence de stress et mutilations, soins ou euthanasie si besoin), avec un enrichissement (litières, boîtes cartons, tunnels) et change qui seront assurés par les animaliers.

13508 La communauté scientifique utilise la souris comme modèle animal pour faire progresser la recherche biologique et médicale.

Notre laboratoire propose différentes prestations permettant la conservation de lignées murines. Ces précieux modèles correspondent à des lignées génétiques qui ne sont pas disponibles dans les établissements fournisseurs d'animaux de laboratoire.

La conservation des lignées se fait sous forme d'embryons et de sperme congelés dans l'azote liquide à -196°C. Elle permet :

- d'éviter le maintien inutile sous forme respirant des lignées quand le chercheur a fini son étude.
- de redémarrer à tout moment un élevage si besoin.

-de bénéficier de modèles animaux déjà existants pour l'ensemble de la communauté scientifique.

Nous estimons faire 120 prestations par an. Le nombre de souris utilisées est proportionnel au nombre de lignées congelées. Notre objectif est d'effectuer davantage de congélations de sperme que de congélations d'embryons ;

Ainsi, en réduisant le nombre de prestations de congélation d'embryons au profit de la congélation de sperme, nous allons réduire de façon très significative le nombre total d'animaux utilisés.

Pour l'ensemble des 600 prestations effectuées par le service cryoconservation en 5 ans, nous estimons la quantité totale d'animaux utilisés à 20 050 souris maximum. Ce nombre prend en compte les animaux utilisés pour réaliser les tests de viabilité de chaque prestation.

Ce projet est totalement en adéquation avec la règle des 3R=

-REDUIRE :

Les mâles vasectomisés sont utilisés pour plusieurs séries d'accouplement ce qui permet de réduire leurs nombres. Grâce à la maîtrise de la microchirurgie, le nombre de femelles anesthésiés/réimplantés est réduit au maximum : pour chaque lignée, 2 femelles sont souvent suffisantes : c'est la qualité des embryons qui nous oblige de temps en temps à effectuer de nouvelles réimplantations.

Pour la congélation de sperme, un nouveau milieu de superovulation nous permet de diviser par 2 le nombre de femelles utilisées lors des tests de fertilités. Pour terminer, pour la congélation d'embryons : l'utilisation de femelles prépubères et une superovulation de ses dernières avant la mise en accouplement permet d'augmenter de manière significative le nombre d'embryons par femelle et donc de réduire leurs utilisations.

-RAFFINER :

Pour l'ensemble de nos microchirurgies, nous attachons beaucoup d'importance au bien-être des animaux pendant et après l'opération :

- Une injection d'anesthésique (kétamine, xylazine) en intra-péritonéale permet d'endormir les animaux et à empêcher toute sensation de douleur.
- De l'ocry-gel est administré sur les yeux des souris pour éviter un assèchement de la cornée.
- Un tapis chauffant réglé à 37°C est installé sous l'animal pendant l'opération afin d'éviter toute sensation de froid.

Autant que possible les animaux sont hébergés en groupe sociaux ; ils ont aussi des enrichissements de milieux mis à disposition.

Nous avons prévu des points limites adaptés et prédictifs en cas de signes de douleurs.

-REEMPLACER :

L'objectif de ce projet étant la production d'embryons ou de sperme il est donc impossible de remplacer les animaux. Mais lorsqu'une de nos prestations est terminée, dans la majorité des cas cela permet de ne pas conserver sous forme respirant la lignée et évite donc l'utilisation d'animaux

en quantité importante. Sur l'ensemble de ce projet ; aucune souffrance n'a été observé à ce jour ; On peut dire que ce qui a déjà été mis en place pour éviter toute souffrance chez les animaux (anesthésique, ocry-gel, tapis chauffant) suffit.

13509 La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche 0. 3% de la population et plus de 1% des plus de 60 ans, la maladie débutant habituellement entre 45 et 70 ans. En France 160 000 personnes sont traitées pour la maladie de Parkinson et plus de 20 000 nouveaux cas apparaissent chaque année. Cette maladie neurodégénérative chronique affecte le système nerveux central et entraîne progressivement des troubles moteurs : mouvements ralentis, tremblements, rigidité puis des troubles cognitifs. Ses causes sont mal connues mais les symptômes moteurs cardinaux sont la conséquence de la perte en neurones dopaminergiques de la substance noire et d'une atteinte des faisceaux nigro-striés. La principale thérapeutique par administration de L-DOPA, un précurseur de la dopamine, améliore les signes cliniques cardinaux du patient.

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une autre maladie neurodégénérative affectant les patients âgés. Cette maladie de la rétine est provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. Elle touche un peu plus de 15% de la population au-dessus de 70 ans. Il existe deux formes de DMLA : atrophique et exsudative. La forme atrophique ou « sèche » est essentiellement caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-rétiniennes et accélérer l'évolution vers la cécité. Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu décryptés. Cependant, il a récemment été mis en évidence dans la DMLA, une accumulation de cellules inflammatoires dans la rétine alors qu'elle en est normalement dépourvue. Ces cellules auraient un rôle pathogène sur la rétine, entraînant une perte définitive des photorécepteurs, menant à la cécité.

Récemment, une étude rétrospective d'une large cohorte de patient a mis en évidence un effet bénéfique de la L-DOPA sur l'apparition d'une DMLA. Les patients traités par L-DOPA semblent développer des DMLA plus tardivement que les patients non traités. Par ailleurs, une autre étude rétrospective a retrouvé une association positive entre DMLA et maladie de Parkinson. Les patients diagnostiqués pour une DMLA avaient un risque accru d'être diagnostiqué d'une maladie de Parkinson dans les 3 ans.

Pour expliquer le lien qu'il peut y avoir entre la maladie de Parkinson, son traitement par L-DOPA et la DMLA, des modèles cellulaires et animaux doivent être expérimentés afin d'explorer les mécanismes physiopathologiques liant ces 2 maladies. Les modèles *in-vivo* seront nécessaires à la validation des résultats positifs obtenus *in-vitro*. En effet, la DMLA est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être modélisée complètement *in vitro*. Les modèles *in vivo* tendent à mimer tout ou partie de la DMLA. L'étude de modèles de souris mimant une maladie de Parkinson, et pour lesquelles une DMLA sera induite, permettra de mieux comprendre le lien entre ces 2 maladies. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 1137 souris.

Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les groupes d'animaux contrôles. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et par le personnel qualifié de l'animalerie. Toutes mesures visant à améliorer le bien-être des animaux et à minimiser leur souffrance et stress seront prises. S'agissant de l'hébergement, toutes les souris auront à disposition des nids en cellulose et des bâtons à ronger. Si nécessaire (exemple : agressivité des mâles), des maisonnettes en carton seront introduites dans les cages d'hébergement. S'agissant des procédures expérimentales, nous aurons recours à l'utilisation d'anesthésiques réglementaires pour les interventions le nécessitant. Les animaux resteront sous étroite surveillance jusqu'à leur réveil. Toute procédure expérimentale sera précédée de 2 semaines d'acclimatation et d'habitation à la contention dans l'animalerie afin de minimiser les stress des animaux.

13510 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune caractérisée par la production d'auto-anticorps (anticorps dirigés contre l'organisme), associée à une inflammation qui peut toucher différents organes. Les traitements actuels (immunosuppresseurs, anti-inflammatoires) sont source de nombreux effets indésirables et ne permettent pas de guérir du lupus. L'objet de nos études est de comprendre les mécanismes aboutissant au développement de cette maladie et de développer des thérapies permettant de cibler certaines des atteintes les plus graves (comme l'atteinte rénale). Nous nous intéressons particulièrement à la réponse immunitaire anormale observée au cours du lupus et nous avons identifié des cellules potentiellement impliquées dans le développement de la maladie. Les souris NZB/W développent spontanément au cours du temps plusieurs symptômes de la maladie lupique que l'on retrouve également dans la pathologie humaine (comme l'atteinte rénale). Nous voulons poursuivre dans cette voie en continuant d'une part à caractériser les réponses anormales chez ces souris afin de développer des cibles thérapeutiques dans le but de pouvoir développer de futurs traitements. Nous testerons l'injection répétée de molécules à visée thérapeutique chez des souris lupique NZB/W ne présentant pas encore de signe de la maladie et chez des souris NZB/W malades. Pour réaliser ce projet nous utiliserons un total de 1372 souris. Ce nombre total a été calculé de façon à respecter au mieux la règle de réduction des 3R. En effet, pour compenser l'hétérogénéité inhérente aux animaux et pour caractériser des populations cellulaires rares dans les organes lymphoïdes, nous avons besoin d'un nombre minimum de 4 animaux par expérience. Afin d'obtenir un résultat exploitable, nous utiliseront des tests statistiques adaptés à un faible nombre d'échantillons. Pour répondre à la question du raffinement, les souris seront hébergées par groupes et les cages seront enrichies avec l'ajout de matériel permettant aux souris de construire un nid. De plus, elles seront anesthésiées avant chaque prélèvement sanguin. Les souris seront manipulées par des personnes compétentes et formées à l'expérimentation animale. Enfin, un tableau de détermination des points limites (indicateur précoce de douleur ou détresse de l'animal) est mis en place : ceci consiste à vérifier de manière quotidienne un certain nombre de paramètres pour évaluer le bien-être de l'animal (mesure du poids, évaluation de l'apparence et de la réactivité de l'animal, de l'interaction avec son environnement, etc). Des points limites sont fixés et si un paramètre dépasse ce seuil d'acceptabilité éthique, l'animal sera soustrait des procédures. Nous ne pouvons pas, ici, assurer la règle du remplacement. En effet, les études ne peuvent en aucun cas être réalisées *in vitro* car il s'agit d'une maladie auto-immune systémique chez l'animal comme chez l'Homme, les études nécessitent donc l'animal entier.

13511 La neuropathie est la complication la plus fréquente du diabète ; sa prévalence peut atteindre 60 %. Ses symptômes sont un engourdissement et une faiblesse musculaire au niveau des membres, des picotements et/ou des sensations de brûlure dans les mains et dans les pieds ; des chocs électriques douloureux ; une extrême sensibilité de la peau, semblable à un coup de soleil douloureux. Dans certains cas, les troubles sensoriels peuvent aussi se manifester par une hyposensibilité qui peut avoir comme conséquence un retard de prise en charge de plaies du pied. Ces complications sont autant de facteurs de risque de développer une dépression. On estime que 30 % des diabétiques ont des tendances dépressives.

L'hyperglycémie provoque une neuropathie diabétique par une atteinte des nerfs périphériques. Le traitement de la neuropathie se résume à un traitement palliatif car aucun médicament n'est capable de guérir les lésions nerveuses. La recherche dans le domaine de la neuropathie diabétique comporte ainsi 2 axes principaux : d'une part, trouver de nouveaux médicaments afin d'améliorer la prise en charge de la douleur et d'autre part découvrir des traitements capables de restaurer la fonction et la structure du nerf altéré.

L'induction du diabète chez l'animal suivi de l'apparition secondaire d'une neuropathie a été largement étudiée et est décrite comme ayant une physiopathologie comparable à la neuropathie des patients diabétiques. La neuropathie diabétique est induite chez le rat après administration de Streptozotocine, un antibiotique toxique pour les cellules productrices d'insuline du pancréas. La disparition de ces cellules entraîne une diminution du taux d'insuline dans le sang et conduit à une hyperglycémie. Plusieurs tests comportementaux vont nous permettre d'évaluer l'efficacité de

nouveaux traitements. Nous évaluerons par des tests comportementaux leur sensibilité et leurs troubles de l'humeur. D'autre part, des mesures électromyographiques nous permettront de mesurer la conduction nerveuse. Finalement, à la fin de l'expérience des prélèvements de peau permettront, comme ce qui est fait chez l'homme, d'évaluer l'innervation de la peau.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, la physiopathologie du diabète implique des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études *in vitro*, toutes les interactions impliquées dans la réponse comportementale *in vivo* ne sont pas possibles à simuler *in vitro*. En particulier, les troubles psychologiques comme la dépression demeurent impossibles à quantifier *in vitro*. Cependant les molécules testées dans ce projet ont fait l'objet d'une sélection sur des tests *in vitro* afin de choisir celles qui ont le plus fort potentiel dans l'indication thérapeutique testée.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), de l'enrichissement (tunnel, brique ou boule de bois), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Les mesures électromyographiques sont effectuées sous anesthésie gazeuse.

Réduire : nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 12 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1800 rats est envisagée.

13512 *Toxoplasma gondii* est un parasite qui infecte environ un tiers de la population en France. Une partie des infectés développe des lésions oculaires. Des études récentes ont montré que la sévérité de l'infection est très variable entre les nombreuses souches de *T. gondii* décrites, notamment au niveau oculaire. En effet, alors que la plupart des souches rencontrées en Europe donnent des pathologies oculaires modérées, des souches Sud-américaines peuvent provoquer des pathologies beaucoup plus sévères. Avec la mobilité mondiale à la fois des humains et des marchandises, dont la nourriture, le nombre d'infections avec des souches exotiques a considérablement augmenté en France. Pour évaluer la relation entre la pathologie et les souches infectantes, nous devrions tout d'abord caractériser les souches chez les patients. La méthode la plus simple serait d'amplifier des séquences d'ADN du parasite par PCR, dans les prélèvements des patients, et déterminer la souche par séquençage. Malheureusement, dans la plupart des infections, la PCR reste négative, à cause d'une quantité trop faible de parasites dans les prélèvements, le plus souvent le sang. Une idée novatrice est de déterminer (typer) la souche via la spécificité des anticorps que le patient a développé contre le parasite. Des publications ont déjà montré la faisabilité de cette approche. Nous voulons profiter de la présence, en France, d'une collection de souches inégalée, pour établir un test sérologique pour typer des souches.

Nous infecterons deux groupes à 6 souris par souche de parasites. Dans le premier groupe, nous prélevons du sang après quatre semaines. Dans le deuxième groupe, nous infectons, après trois mois, les souris de nouveau avec la même souche, pour obtenir une forte production d'anticorps. Deux semaines après cette deuxième infection, le sang de ces souris est prélevé. Le sang sert ensuite pour mettre à point un test multiplex pour la détection des anticorps souche-spécifiques.

Nous allons utiliser une souche pour chacune des 6 clades (types de souches) décrites dans la littérature. En plus, un groupe de souris non-infectées sera utilisé comme témoin négatif. Pour le projet, nous demandons donc par souche 6 souris x 2 groupes d'infection (1 mois et 3 mois) = 12 souris. Le nombre de 6 souris par groupe doit toujours garantir l'obtention de 5 échantillons par

groupe, le minimum pour les tests statistiques choisis, même en cas de mort précoce d'une souris. Nous analyserons 6 souches + les souris non-infectées, ce qui donne un total de 84 souris demandées.

Pour respecter la règle des 3R :

Réduction : Les réactivités des anticorps contre les antigènes des différentes souches de parasites seront comparées par des tests statistiques adaptés. Nous utiliserons le minimum de souris pour permettre de faire face à la variabilité naturelle de la spécificité des anticorps et d'éventuelle mort précoce d'une souris, donc 6 souris par groupe.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera assuré par l'enrichissement de l'environnement des animaux, par des lanières de carton et des tunnels, et la formation des groupes sociaux, dans le souci de permettre un comportement naturel aux souris. Les animaux sont manipulés par des personnes formées et compétentes de façon de réduire le stress induit par la manipulation. Le protocole d'infection avec inoculation d'une faible dose, ainsi que le traitement des souris avec un médicament anti-parasitaire, résultera, par expérience, en une infection très peu ou pas douloureuse pour la souris.

Remplacement : La caractérisation de la production d'anticorps par une souche de parasites définie passe nécessairement par des animaux. Par contre, cette étude permettra de faire ensuite des tests de routine *in vitro* pour déterminer la souche infectante, au lieu d'une inoculation chez la souris, pratiquée aujourd'hui.

13513 Les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) représentent une cause importante de morbi-mortalité chez les sujets âgés de 65 à 85 ans et un coût socio-économique conséquent. La physiopathologie des AAA est encore méconnue. Sans traitement chirurgical, le devenir de l'AAA chez l'homme est la rupture de la paroi aortique. Des études chez l'homme et la souris ont montré que les mastocytes, des cellules connues pour leur rôle délétère dans les allergies, sont présents en plus grand nombre dans les aortes malades. Les mastocytes pourraient notamment participer à la rupture des anévrismes, ou au contraire participer à leur cicatrisation. Cependant, les études chez l'homme et les modèles animaux existant ne permettent pas de déterminer avec certitude si et comment les mastocytes participent à la progression des AAA.

Nous allons développer par croisement un nouveau modèle de souris transgénique, dans lesquels il est possible d'induire des anévrismes par infusion d'angiotensine, et dans lesquelles il est possible de supprimer les mastocytes de façon inductible par l'injection d'une drogue. La comparaison des souris déplétées en mastocytes à différents stades de développement des AAA ou non déplétées nous permettra de comprendre le rôle des mastocytes dans le développement et la progression des AAA.

Ceci, en parallèle à des études sur des échantillons humains, pourrait conduire à de nouveaux traitements (ciblant les mastocytes) visant à diminuer le risque de rupture chez les patients avec AAA.

Ce projet respecte la règle des 3R. Le développement des AAA est un processus complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires, et l'étude de l'impact des mastocytes sur les AAA ne peut donc se faire que sur des organismes vivants, ayant un système immunitaire proche de l'homme, comme les souris, et ne permet pas le remplacement par des études *in vitro*. Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 160 souris, pour une durée de 2 ans. Le fonds génétique des souris est contrôlé et homogène. Les souris contrôles proviennent des mêmes croisements que les souris mutées. Enfin, une étude statistique pour le calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux et éviter toute souffrance inutile : calcul de la taille de l'échantillon avec le logiciel JMP pour une puissance de 20% pour les expériences d'AAA et de 80% pour les tests de déplétion et un risque alpha de 5%, en prenant en compte des données précédentes de la littérature et du laboratoire. Ces facteurs vont réduire fortement la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux nécessaires. Afin de respecter le principe de raffinement, les animaux seront observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie et tout comportement anormal sera directement communiqué à la personne responsable du projet.

De plus, les animaux seront observés régulièrement (au moins 1 fois par semaine) par les expérimentateurs confirmés responsables du projet connaissant bien les modèles utilisés. Enfin, les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement. Les procédures le nécessitant sont réalisées sous anesthésie, et les souris sont alors placées sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil.

13514 La dépression est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe. Elle représente en ce sens un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression et dans la résistance aux traitements antidépresseurs reste encore limitée à ce jour. De nombreuses données, obtenues notamment dans notre laboratoire, montrent que la composante inflammatoire et immunitaire est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements. L'étude de la voie neuro-immunitaire semble donc un candidat de choix pour le développement de nouveaux traitements alternatifs à la pathologie dépressive.

Les objectifs de cette étude seront d'évaluer le rôle de l'inflammation dans le développement de troubles de type dépressifs chez la souris, ainsi que les mécanismes impliqués. Plus précisément, nous étudierons l'impact de l'inflammation aiguë et chronique sur le fonctionnement des systèmes de neurotransmission monoaminergique, cibles des antidépresseurs classiquement utilisés aujourd'hui (dopamine, sérotonine). Pour cela, nous utiliserons un modèle d'inflammation induite par un agent bactérien (LPS, lipopolysaccharide) en traitement aiguë induisant une réponse inflammatoire massive et transitoire, ou chronique par exposition à un stress chronique et/ou à un régime hyperlipidique hypercalorique, induisant un état inflammatoire modéré mais continu. Ces états inflammatoires sont connus pour s'accompagner de symptômes de type dépressif. Les animaux seront caractérisés sur le plan comportemental (évaluation de l'état émotionnel, anxieux, dépressif, cognitif), biochimique (dosages périphériques et centraux d'hormones, de facteurs pro- ou anti-inflammatoires) et neurochimique (dosage de neurotransmetteurs, activité de synthèse et de dégradation). L'effet de la modulation pharmacologique de ces systèmes monoaminergiques (voie de synthèse, stimulation ou blocage des récepteurs des monoamines) ou nutritionnelle (apport d'acides aminés essentiels (tyrosine, tryptophane), cofacteur BH4), sera également évalué sur les mêmes paramètres comportementaux, biochimiques et neurochimiques.

Les expérimentations décrites dans ce projet seront conduites dans le plus strict respect des règles et lois éthiques en vigueur. Pour le respect de la règle des 3R, la solidité de nos hypothèses de travail en utilisant des groupes expérimentaux de 12 animaux pour assurer la fiabilité statistique, et la qualité de la mise en œuvre des procédures, basée sur l'expertise des expérimentateurs, permettront de contrôler au plus juste le nombre d'animaux utilisés. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur (anesthésie, utilisation d'antalgique lors des chirurgies) et l'inconfort (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement) des animaux. Ce projet de 2 ans sera réalisé sur 912 souris mâles adultes.

13515 Une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* (SC) a été homologuée pour les chevaux par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) avec l'allégation « amélioration de la digestibilité ». Pour le renouvellement par l'EFSA de l'homologation de cette levure il est nécessaire de réaliser en conditions contrôlées trois tests d'efficacité *in vivo*. Le présent projet vise à mener l'un de ces tests au cours duquel sera mesuré l'effet d'une supplémentation avec trois doses de levure SC sur la digestibilité totale de la ration chez le cheval.

Le projet doit obligatoirement être réalisé sur des chevaux car c'est l'espèce cible requise pour une homologation européenne du probiotique testé. Vingt chevaux adultes, hongres, de race Trotteur Français seront intégrés dans le projet. L'utilisation de vingt individus se justifie pour obtenir la puissance statistique nécessaire pour les dossiers EFSA. Les chevaux seront répartis en quatre groupes de cinq chevaux. Durant une première période tous les chevaux recevront une ration « témoin ». Dans la deuxième période, un groupe continuera à recevoir la ration « témoin » alors que

les trois autres groupes recevront cette ration supplémentée avec l'une des trois doses testées. Chaque période durera quatre semaines.

A la fin de chaque période, la digestibilité de la ration sera mesurée par récolte totale des fèces pendant quatre jours grâce à des harnais de digestibilité. Un prélèvement de fèces sera effectué dans un travail par fouille rectale le jour précédant la pose des harnais de digestibilité afin d'évaluer les modifications des paramètres de l'écosystème fécal.

Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer :

- les signes de mal-être correspondant à des comportements inhabituels : refus de tout ou partie de son repas, stéréotypies, évitement du contact avec l'humain.
- Les signes de souffrance correspondant à des comportements inhabituels : cheval campé, abattu, prostré, agité.

Le personnel animalier signale les signes inhabituels au responsable de l'expérimentation.

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

13516 En 2018, le Centre International de Recherche sur le Cancer a recensé 18 millions de nouveaux cas et 9,6 millions décès de cancer dans le monde.

Ainsi, l'oncologie est l'un des principaux domaines de recherche dans les nouvelles thérapies. En raison des difficultés inhérentes à la recherche et au développement de traitements anti-cancéreux *in vitro*, il est essentiel de développer des modèles appropriés chez l'animal et en particulier des modèles de greffes de cellules tumorales humaines chez la souris (xénogreffe).

L'objectif du projet est la mise en place de modèles oncologiques chez la souris, après transplantation de cellules cancéreuses par injection sous cutanée, afin d'évaluer l'activité pharmacodynamique, l'efficacité et la pharmacocinétique d'agents anti-tumoraux. Ces modèles sont syngéniques (les cellules greffées sont de la même origine que l'animal) ou xénogéniques (les cellules tumorales greffées sont d'origine humaine, ceci impliquant alors d'utiliser des animaux immunodéficients).

Le développement tumoral et/ou la régression tumorale suite à un traitement thérapeutique sont évalués par calcul du volume de la tumeur et par imagerie (les cellules cancéreuses injectées étant luminescentes).

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de documenter et d'étudier l'implantation et le développement de différents types cellulaires cancéreux dans un environnement complexe et entier (la souris).

Ces modèles permettront ainsi de démontrer l'activité pharmacodynamique et l'efficacité *in vivo* d'agents anti-tumoraux en lien avec le mécanisme d'action ciblé.

Le cas échéant, une concentration, tissulaire et/ou plasmatique, de ces agents pourra être mesurée.

Les données ainsi obtenues contribueront à la sélection de candidats médicaments et au choix des doses à utiliser chez l'homme pour les indications thérapeutiques visées, comme les lésions précancéreuses et cancéreuses.

Domages escomptés: L'implantation sous-cutanée de cellules cancéreuses chez la souris induira le développement d'une tumeur primaire (locale et issue de l'implantation sous-cutanée) et pourra se propager en tumeurs secondaires (métastases) bien que peu fréquent dans ce type de modèle même lorsque les tumeurs implantées sont très agressives. Cela peut entraîner de la souffrance chez l'animal. Aussi des points limites seront définis afin de prendre les mesures adéquates le cas échéant. De plus, l'utilisation de cellules marquées (luminescentes) permettra de localiser la tumeur *in situ* dans l'animal, d'estimer en temps réel sa croissance et son évolution, mais également d'observer la naissance de métastases, ce qui permettra d'estimer de façon précoce la souffrance potentielle de l'animal.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe pas de méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale, car il s'agit de phénomènes complexes devant être étudiés dans un organisme entier et vivant, pour répondre aux questions d'efficacité, de pharmacologie et de pharmacocinétique adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

Choix des espèces: L'espèce souris est utilisée en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence des outils d'analyses *ex vivo* spécifiques de ces espèces comme par exemple des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes.

Des animaux immunodéprimés seront utilisés dans le cas d'implantation de cellules humaines.

Nombre d'animaux:

Le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables ; Sur une période de 5 ans, 10200 souris seront nécessaires pour la réalisation des procédures expérimentales.

Conditions d'hébergement et de soins:

Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux.

Les animaux sont hébergés en cage transparente afin de garder un contact visuel entre congénères, ce qui minimisera le stress engendré.

L'hébergement est enrichi par la mise en œuvre de techniques d'enrichissement adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux (ex : présence de tunnel dans la cage, musique...).

Dans le cas d'utilisation d'animaux immunodéprimés, ceux-ci seront hébergés en portoirs ventilés afin de garantir leur statut sanitaire.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse...) et ainsi de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, des protocoles d'analgésie ont également été établis afin de minimiser au maximum d'éventuelles douleurs dues aux procédures expérimentales.

13517 L'obésité est associée à des troubles neurocomportementaux, physiologiques, métaboliques et cérébraux bien décrits chez l'Homme et le modèle miniporc. L'électroacupuncture (EA) est une thérapie moderne, basée sur les théories de la médecine chinoise traditionnelle, qui a démontré des effets bénéfiques significatifs chez l'Homme et les modèles rongeurs obèses. Cependant, des études précliniques sur un modèle animal proche de l'Homme, comme le miniporc, sont nécessaires pour 1) explorer les mécanismes impliqués dans ces effets au niveau de l'axe intestin-cerveau, et 2) proposer un paradigme de stimulation spécifiquement conçu pour moduler les zones cérébrales impliquées dans le comportement alimentaire. Cette étude sera divisée en 2 étapes : Etape 1, comparaison des effets neurophysiologiques aigus de l'EA entre quatre paradigmes différents, correspondant à des combinaisons spécifiques de points d'acupuncture, dont un paradigme « sham » ou contrôle, et choix de la meilleure stratégie ; Etape 2, exploration des réponses cérébrales à l'EA et validation des effets thérapeutiques de cette stratégie d'EA chez des miniporcs obèses. L'Etape 1 sera réalisée sur 4 miniporcs adultes normopondéraux exposés de façon successive aux 4 paradigmes d'EA, en respectant un carré latin. Chaque session d'EA durera 20-25 min. Différents prélèvements sanguins ou salivaires (glucose, hormones gastro-intestinales, cortisol, etc.) et des mesures neurophysiologiques (ECG, thermographie corporelle, EEG) seront réalisés au cours de chaque session d'EA. L'Etape 2 sera réalisée sur 16 miniporcs adultes. Les animaux passeront initialement en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) pour explorer les réponses cérébrales à une session d'EA. Ensuite, ils seront rendus obèses à partir d'un régime hypercalorique enrichi en lipides et sucres, avant de bénéficier de 12 sessions d'EA étalées sur 4 semaines. Des

prélèvements sanguins et salivaires (glucose, hormones gastro-intestinales, cortisol, marqueur inflammation, etc.) seront réalisés avant obésité et après traitement. Un test de tolérance oral au glucose sera réalisé en fin de traitement uniquement. Les animaux passeront ensuite une seconde fois en IRMf pour explorer leurs réponses cérébrales à une stimulation gustative sucrée. Ils seront ensuite soumis à des tests comportementaux (choix alimentaire et tâche cognitive renforcée par l'aliment) avant d'être euthanasiés pour que des prélèvements biologiques (intestin, foie, cerveau) puissent être effectués. Une anesthésie de niveau chirurgical sous monitoring et à l'isoflurane sera réalisée en amont des mesures physiologiques pour implantation d'un cathéter de prélèvement veineux. L'analgésie per et post-opératoire sera réalisée avec du chlorhydrate de morphine et un traitement antibiotique prophylactique sera appliqué. Une anesthésie de courte durée (20-25 min) et sans douleur au Zolétil 50 par intraveineuse sera réalisée à chaque session d'EA. Le protocole d'anesthésie à l'isoflurane sera utilisé pour les IRMf sous respirateur et monitoring. Les données physiologiques et comportementales seront analysées par ANOVA à multiples facteurs pour étudier les effets du traitement, du sexe, et de leurs interactions, mais compte tenu des effectifs réduits, une analyse non-paramétrique par test de Mann-Whitney sera aussi réalisée. Les données issues des imageries cérébrales seront analysées par cartographie statistique paramétrique (SPM) qui représente la méthode de référence pour ce type d'analyse. REDUIRE : Les effectifs animaux utilisés pour cette étude correspondent à un minimum pour bénéficier d'une puissance statistique appropriée aux mesures réalisées. RAFFINER : Les approches d'imagerie et de chirurgie ont été choisies et optimisées de manière à être le moins invasif possible (i. e. imagerie *in vivo* sur animaux anesthésiés, anesthésie légère pour l'EA avec un protocole spécifique). REMPLACER : Enfin, le modèle miniporc est le seul modèle animal chez lequel des anomalies cérébrales similaires à celles décrites chez l'Homme obèse ont été mises en évidence. Aucune approche *ex vivo* ne permettrait de répondre aux objectifs annoncés.

13518 Les aliments représentent non seulement une source de nutriments pour la croissance corporelle et le maintien des fonctions essentielles, mais comprennent également des composants diététiques qui sont reconnus et peuvent être métabolisés par l'organisme.

Des recherches effectuées chez la souris et chez l'homme ont révélé l'impact du régime alimentaire sur la modulation du microbiote intestinal. En outre, les modifications induites par la variation de l'alimentation peuvent se produire dans un court laps de temps. Cela pourrait avoir un impact sur la modulation de la quantité de « bonnes » ou de « mauvaises » espèces bactériennes. Compte tenu de ce qui précède, d'autres modifications des compositions alimentaires en termes de micro / macronutriments peuvent, si elles sont directement traitées par microbiote ou via des métabolites ajoutés, moduler la fonction immunitaire et la réponse aux maladies malignes ou infectieuses. D'après la littérature, le régime alimentaire est capable d'influer sur la réponse aux immunothérapies.

Consommer moins de glucides et de calories pourrait aider à prévenir et contrôler le cancer, et augmenter l'efficacité des traitements classiques. La littérature montre déjà quelques résultats sur les effets de la restriction calorique, du régime cétogène et du jeûne intermittent dans des modèles expérimentaux. Dans cette analyse, 90,9 % des études montraient que la restriction calorique avait un rôle anticancer. Les auteurs signalent aussi qu'une méta-analyse sur la restriction calorique et les cancers du sein a montré que les souris restreintes en énergie développaient 55 % de cancers du sein en moins que les témoins. Les études concernant le jeûne intermittent ne permettaient pas de conclure quant à son rôle dans la prévention du cancer, en revanche, le régime cétogène semblait efficace contre le cancer.

En effet, dans les cellules tumorales, nous observons une augmentation de l'absorption du glucose, un taux élevé de glycolyse allant jusqu'à 200 fois comparés aux cellules « normales ».

Dans notre étude, nous souhaitons à travers l'utilisation d'un régime cétogène, contrôler le métabolisme altéré des cellules cancéreuses en limitant leur apport en carbohydrates et en augmentant leur métabolisme oxydatif. De cette façon, nous pensons pouvoir améliorer ainsi la réponse à l'immunothérapie.

Par ailleurs sachant qu'un régime cétoène est très contraignant, nous souhaitons trouver des suppléments du régime avec les métabolites qui permette l'efficacité du régime cétoène.

Pour cela, nous administrerons un régime cétoène où nous compléterons le régime normal avec des métabolites que nous identifierons comme augmenté dans les régimes cétoènes. Ces expérimentations vont nous permettre de déterminer des régimes alimentaires et des métabolites ajoutés aux régimes alimentaires contrôlés améliorant la réponse aux immunothérapies, et ainsi d'envisager une supplémentation en métabolites dans le régime contrôle ou des cures de régimes cétoènes comme traitement adjuvant (additionnel) aux traitements anti-cancéreux.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, le microbiote, le métabolisme, l'immunité anti-tumorale et l'effet des immunothérapies sur la réponse anti-tumorale dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*. Le projet nécessitera 6120 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, les différents régimes ou supplémentation de régime utilisés et les différents types de cellules tumorales utilisés. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie locale ou générale dépendant des gestes techniques.

Les contraintes principales pour les animaux seront pour certaines procédures l'implantation de tumeurs. Ces contraintes seront limitées par un suivi très strict avec application de points limites, limitation des tailles de tumeurs par mesure physique (sous-cutanée) ou au moyen d'imagerie optique de luminescence des animaux (qui permet aussi un suivi longitudinal non invasif plus raffiné)

13519 La thérapie génique constitue une approche prometteuse pour traiter différentes pathologies dont les maladies génétiques dites monogéniques. Ces pathologies sont la résultante de la mutation d'un gène qui entraîne l'absence ou bien l'inactivité d'une protéine physiologique. A ce jour, la thérapie génique apparaît comme l'unique stratégie thérapeutique existante pour la grande majorité de ces pathologies qui peuvent être extrêmement sévères. Cette thérapie consiste en l'apport d'un gène médicament (transgène) au sein de cellules à traiter. Le transgène est le plus couramment véhiculé vers ces cellules cibles par le biais de vecteurs viraux recombinants. Bien que très efficace, leur efficacité à long terme est limitée par l'apparition de réponses immunitaires dirigées contre le vecteur ou contre la protéine thérapeutique codée par le transgène. Les travaux que nous développons ici ont pour objectif de neutraliser ces réponses immunitaires délétères dans le contexte de la thérapie génique afin d'en améliorer son efficacité à long terme. Les stratégies que nous envisageons ici ont pour objectif de manipuler les mécanismes naturels de tolérisation immunitaire en se basant notamment sur les propriétés tolérogènes des cellules endothéliales sinusoidales (LSECs) résidant dans le foie. Ces cellules sont connues pour leur capacité à rendre tolérantes les cellules immunitaires et leur manipulation ciblées dans ce projet devrait permettre d'améliorer considérablement l'efficacité à long terme de la thérapie génique. L'évaluation de cette stratégie prometteuse se fera dans un modèle de thérapie génique musculaire chez la souris qui est reconnu par la communauté scientifique, dans le respect de l'éthique et de la réglementation en vigueur pour le bien-être animal. Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'absence de modèle *in vitro* de remplacement en capacité de mimer les réponses immunologiques conséquentes à l'injection intramusculaire d'un vecteur viral de type AAV. Le choix de la souris repose sur la connaissance du système immunitaire de cette espèce, sur l'abondance des outils d'analyse des réponses immunitaires à disposition et par sa proximité phylogénétique avec l'homme qui permet d'envisager la transposition en clinique des stratégies évaluées. Ce projet requiert ainsi l'utilisation d'au maximum 660 souris C57BL/6 sur une durée de 5 ans. Le raffinement est permis par l'utilisation

de femelles, non sujettes aux caractères dominants associés à des combats et blessures, qui seront hébergées tout au long de l'expérimentation en portoir ventilé, à raison de 5 animaux par cage. Ces animaux disposeront de nourriture et d'eau à volonté, ainsi que d'un enrichissement du milieu avec du coton (cell-nest) et d'un abri de cellulose. Les animaux seront anesthésiés et analgésiés lors de chaque procédure susceptible d'induire une souffrance et les éventuels points limites anticipés. Enfin, la réduction est permise par le choix d'effectif de souris basé sur des analyses statistiques optimisées ainsi que sur l'expérience de précédents protocoles analogues menés au laboratoire. Ce projet devrait contribuer à améliorer considérablement l'efficacité à long terme de la thérapie génique.

13520 Les altérations des milieux aquatiques par les efflorescences de cyanobactéries sont susceptibles de modifier le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Les préjudices associés à ces efflorescences comprennent : des perturbations de la chaîne trophique, une diminution de la pénétration de la lumière dans l'eau, une diminution de l'oxygène dissous disponible, mais également la production de métabolites secondaires potentiellement bio-actifs et parfois toxiques pour certains organismes qui y sont exposés. En effet, de nombreux genres de cyanobactéries sont susceptibles de produire et/ou de relarguer dans le milieu aquatique des molécules aux propriétés éminemment, ou potentiellement, bio-actives, délétères, voire toxiques. Si les effets toxicologiques (sensus stricto) de ces micro-organismes et de leurs métabolites sont connus sur certaines cellules ou tissus de vertébrés, notamment téléostéens, on ignore leur impact sur le microbiote procaryote associé (i. e. la communauté microbienne associée). Des travaux menés ces dernières années ont montré que le microbiote, localisé à l'interface entre un organisme et le milieu extérieur, peut jouer un rôle important dans la physiologie de l'hôte, mais aussi dans de nombreux traits chez les Vertébrés, parmi lesquels la résistance aux pathogènes.

Le présent projet propose d'étudier l'effet de l'exposition à des doses représentatives des conditions environnementales de métabolites de cyanobactéries sur le microbiote bactérien associé à la peau, aux branchies et au tube digestif d'un téléostéen modèle, le médaka. A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur le compartiment microbien. On ignore s'il est altéré, et s'il pourrait jouer un rôle lors d'événements d'expositions aux cyanobactéries. L'objectif est ici de tester l'hypothèse d'une modification du microbiote lors d'expositions à des métabolites produits par certaines souches de cyanobactéries.

Dans le cadre de l'étude de l'interaction du microbiome associé à un organisme, seules les expérimentations réalisées sur organismes vivants sont susceptibles de retracer la complexité des interactions avec les micro-organismes associés. Ce travail, se positionne dans le cadre d'une réflexion sur la réduction des organismes utilisés à des fins expérimentales et cherche ainsi à optimiser le nombre d'organismes tout en assurant une qualité suffisante d'informations générées permettant de mener un raisonnement scientifique, étayant les hypothèses à tester. Les expérimentations seront effectuées avec un nombre de réplicats judicieux et suffisants (n=3) pour permettre d'ingérer les aléas dus à la variabilité biologique expérimentales, tout en respectant la règle des 3R, notamment quant à la réduction des effectifs employés et le raffinement en travaillant à des doses environnementales situées proches des NOEC afin de limiter les potentiels effets toxicologiques. Ce sont au total 252 poissons qui seront exposés pendant 28 jours à différentes conditions d'enrichissement de l'eau en cyanobactéries ou en extraits de biomasses cyanobactériennes. Chaque individu sera ensuite disséqué après sacrifice et l'ADN sera extrait de chaque tissu (peau, branchie, tube digestif). En parallèle, l'ADN sera extrait de l'eau issue des bacs de chaque traitement, ainsi que de la nourriture utilisée pour les poissons (contrôles).

La composition des communautés bactériennes sera étudiée par le séquençage haut débit d'une zone hypervariable du gène codant l'ARNr 16S à partir des extraits d'ADN. Les séquences obtenues permettront d'identifier la diversité des unités taxinomiques opérationnelles (OTUs) présentes, et la composition des communautés associées aux différents tissus et traitements sera comparée à l'aide d'analyses statistiques uni- et multivariées. Une analyse quantitative de la colonisation bactérienne des différents tissus échantillonnés sera réalisée par hybridation in situ (FISH) sur coupes histologiques, et des paramètres physiologiques seront examinés chez les animaux : index hépato-

somatique, dommages cellulaires hépatiques, poids...Les facteurs testés seront le type d'exposition, le type de tissu et la variabilité entre les réplicats.

13521 Au sein du cerveau, de multiples analyses sont nécessaires pour cartographier les connexions neuronales et pour déterminer la nature des interactions entre les différentes structures cérébrales. Notre projet vise à explorer les éventuelles altérations des systèmes de neurotransmission, dans différents modèles pathologiques au cours des périodes développementales. Cependant afin de visualiser des modifications dans un modèle pathologique, il nous faut dans un premier temps cartographier ces connexions neuronales chez l'animal sain.

Pour ce projet qui se focalise sur l'organisation et le développement des systèmes de neurotransmission du cerveau chez la souris sauvage, nous allons faire appel au total à 81 souris dans une période de 2 ans. La nature de ce projet ne rend pas possible de le reproduire, ni de l'étudier dans des modèles de cultures cellulaires *in vitro*.

Ce projet a été planifié pour appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement dans le respect de la règle des 3R permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Pour prendre en compte le principe de réduction, les données seront analysées en fonction de la progression des résultats, permettant d'éviter les expériences inutiles. Si possible, nous appliquerons plusieurs protocoles par expérience, pour minimiser le nombre d'animaux utilisés. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect physique et comportemental. Si nécessaire, des mesures seront prises pour réduire leur stress et leur douleur. Avant toute manipulation douloureuse, une combinaison d'anesthésique et sédatif sera administrée avec une dose calculée en fonction du poids de chaque animal. Pour soulager le stress, les animaux seront d'abord familiarisés avec l'expérimentateur et habitués à la salle d'expérimentation. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux en cages équipées de l'enrichissement de base (maison en carton pour rongeurs qui permet aux animaux de dormir et de se reposer, en plus de participer à leur exercice physique : grimper et explorer) et de matériaux de nidification, et dans un environnement avec température, lumière et hygrométrie contrôlées avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau.

13522 Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est une pathologie valvulaire cardiaque fréquente, caractérisée par une accumulation de calcium au niveau de la valve cardiaque aortique, et pour lequel aucun traitement médical n'est à ce jour disponible. La seule option disponible à ce jour est le remplacement valvulaire par chirurgie à cœur ouvert. La prothèse ainsi implanté peut aussi elle-même dégénérer avec le temps. Cette pathologie a des répercussions importantes sur le muscle cardiaque.

L'impact du cholestérol dans les processus physiopathologiques entraînant le développement de cette maladie est bien reconnu. PCSK9 est une protéine importante impliqué dans le métabolisme du cholestérol et nos données préliminaires supportent le fait qu'elle pourrait donc jouer un rôle important dans le développement de cette pathologie, autant au niveau de la valve native, que de la bioprothèse ou du remodelage ventriculaire cardiaque.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer le rôle de PCSK9 dans le développement de calcification valvulaire, des bioprothèses et son potentiel impact sur le remodelage ventriculaire. Ce projet permettra donc de valider la pertinence de PCSK9 comme cible thérapeutique pour cette pathologie.

Ce projet va s'appuyer sur l'étude d'un modèle animal de souris invalidé pour PCSK9, qui permettra d'identifier les mécanismes mis en jeu lors du développement de la pathologie. Des souris sous exprimant PCSK9 seront comparées à des souris sur-exprimant la protéine et à des contrôles.

Un total de 3190 souris est nécessaire à la réalisation de ce projet.

La durée de l'étude est de 5 ans.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour étudier l'effet de PCSK9 sur le développement de la pathologie, et ainsi confirmer la cible thérapeutique que pourrait être cette protéine.

L'ensemble de ce projet prend en compte la règle des 3R :

- Réduire le nombre d'animaux utilisés en se basant sur nos préliminaires. Le nombre d'animaux nécessaires à cette saisine prend en compte cette règle.
- Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès le début des procédures et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie.
- Raffiner en hébergeant les souris dans des cages de 5 avec enrichissement.

13523 Aujourd'hui, la chimiothérapie et la radiothérapie restent les traitements de référence dans la majorité des cas de cancer. Or, l'efficacité de ces traitements est dépendante de la réponse immunitaire anti-tumorale qu'ils déclenchent. Grâce à un modèle informatique prédictif, nous avons identifié plusieurs agents potentiellement capables, en tuant les cellules cancéreuses, d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale. Parmi ses agents figure une chimiothérapie utilisée en clinique pour traiter des cancers de l'enfant. *In vitro*, nous avons étudié les mécanismes induits par cet agent et avons confirmé qu'il active différents mécanismes précurseurs de l'activation des cellules immunitaires. Nous avons ensuite observé chez la souris que son effet est dépendant du système immunitaire. L'objectif est maintenant de confirmer cela dans d'autres modèles de cancer, de caractériser la réponse immunitaire induite par ce traitement et enfin de tester son effet en combinaison avec des immunothérapies. Cela pourrait permettre la mise en place de nouvelles stratégies de traitements anti-cancéreux plus efficaces et d'adapter son usage au profil du patient.

Ce projet d'une durée de 3 ans consistera à implanter sous la peau de souris sous anesthésie des cellules tumorales, de traiter les tumeurs avec notre chimiothérapie d'intérêt puis de mesurer la croissance tumorale et faire un suivi clinique dans un premier temps ; de récupérer les tumeurs pour étudier l'infiltrat immunitaire dans un deuxième temps (cellules immunitaire ayant infiltré la tumeur). Cela nécessitera au maximum 710 animaux, en incluant les groupes contrôles. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement.

Ce projet ayant pour objectif de déterminer la réponse immunitaire induite par des traitements, nous avons besoin d'un modèle mimant le plus fidèlement possible l'environnement tumoral et le système immunitaire. Comme il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *in vitro/ex vivo* du fait de sa complexité, il est absolument nécessaire d'avoir recours à un modèle animal. Pour ce projet, nous avons choisi le modèle souris ; c'est en effet le mammifère le plus facile et le plus utilisé en expérimentation animale car suffisamment petit pour en avoir un certain nombre, facile à manipuler et suffisamment grand pour pouvoir recevoir des injections de cellules tumorales.

Le nombre d'animaux par groupe a été calculé à l'aide d'un modèle statistique dans le but d'utiliser le minimum de souris permettant d'observer une différence statistiquement significative. Le nombre de groupes proposé inclut les groupes contrôles nécessaires. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude est divisée en plusieurs procédures séquentielles et sera arrêtée si une des procédures invalide l'hypothèse de travail ; le nombre de souris sera ainsi diminué. Par ailleurs, une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Les expérimentations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié et expérimenté sur le plan technique et par ailleurs formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être. Concernant l'enrichissement du milieu, les animaux disposeront de coton dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. La surveillance régulière permettra le suivi du comportement (prostration, autoaggression, etc) et de la croissance tumorale, afin de mettre en place des soins et le cas échéant d'arrêter les procédures dès l'atteinte éventuelle d'un point limite.

13524 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent

la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années une meilleure prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres centraux chroniques tels que : épilepsie, dépression, démence progressive...À ce jour, aucun traitement n'est proposé pour limiter le risque de mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Le projet s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires des conséquences chroniques d'un traumatisme crânien dans le but de développer des approches thérapeutiques efficaces.

L'originalité de l'étude proposée joue sur la globalité, c'est-à-dire : i) appréhender les changements qui se mettent graduellement en place au sein de l'unité neurovasculaire par recherche de perturbations du débit sanguin cérébrale et de modifications de la structure de la barrière hémato-encéphalique, ii) évaluer les conséquences qui sont l'activation de processus de neuro-inflammation, des perturbations de l'activité neuronale, des troubles du comportement.

Nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle déjà approuvé de traumatisme crânien chez la jeune souris, peu invasif. Nous disposons d'outils d'imagerie dédiés au petit animal de dernière génération : écho doppler et microscope bi-photonique. Ils permettront d'étudier et de suivre les processus de dégénérescence du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme. Nous possédons déjà une bonne expertise en clinique et en recherche sur les pathologies cérébrovasculaires associées aux dysfonctionnements neuronaux.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

Remplacer : L'étude proposée à partir d'un modèle de traumatisme crânien chez la souris ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau intégré d'informations.

Réduire : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Les protocoles choisis, de classes légères à modérées, déjà utilisés en routine, n'induisent pas de morbidité. Le suivi longitudinal non invasif réalisé en imageries, en électro-encéphalographie et en comportement permet de réduire le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet.

Raffiner : le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique et de recherche formé et qualifié. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Nous y veillerons par observation quotidienne. Tous les protocoles s'effectueront sur l'animal anesthésié. Les chirurgies seront effectuées en conditions d'asepsie, avec maintien de la température corporelle, une analgésie post-opératoire sera délivrée. En cas de complications infectieuses, une prophylaxie par antibiotiques sera mise en place.

Ce projet nécessite dans son ensemble 540 souris.

13525 Les causes d'une inflammation chronique au cours de l'obésité restent à explorer mécaniquement. Parmi les différentes voies de l'inflammation nous proposons d'étudier des voies de l'immunité innée, en particulier les voies de reconnaissance des acides nucléiques, peu explorées dans ce contexte. Nous étudierons l'activation de ces voies chez la souris obèse après régime gras via l'effet d'une délétion de certains des acteurs principaux de ces voies sur le métabolisme énergétique et la tumorigénèse ; en particulier dans le cadre du cancer du sein et de la prostate.

Dans ce projet, 5 approches complémentaires (procédures) seront utilisées pour évaluer :

1. Effet de l'activation des voies de l'immunité innée sur métabolisme énergétique

2. Etude de l'immunité innée et de l'inflammation chronique sur la tumorigénèse: Allogreffe en sous-cutanée
3. Etude de l'immunité innée et de l'inflammation chronique sur la tumorigénèse: Allogreffe en orthotopique
4. Modulation pharmacologique des voies de l'immunité innée
5. Modulation pharmacologique de l'inflammation chronique au cours de la tumorigénèse en condition d'obésité

Au maximum, 2016 souris pourront être utilisées pour ces 5 procédures.

Durant ce projet nous suivrons le principe des 3R qui consiste à remplacer, réduire et raffiner. Pour cela nous avons mis en place une lignée *in vitro* d'adipocytes et de cellules cancéreuses afin d'étudier le lien entre obésité et cancer dans le cadre de notre projet.

Une étude statistique préalable et un nombre adapté de souris par groupe expérimental nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisé. Et enfin un suivi hebdomadaire des animaux, une prise en compte des points limites (volume tumorale et poids des animaux), une évaluation de la douleur (grille d'évaluation de la douleur/utilisation d'analgésique) lors des chirurgie/expériences (anesthésie, analgésie, établissement de points limites spécifiques) et des besoins biologiques et sociaux des animaux nous permettent de raffiner notre projet.

13526 Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charges des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés avec un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. De plus, des études expérimentales sur des souris transgéniques obèses ont confirmé une exacerbation de l'inflammation. A l'inverse, une diminution de l'apport calorique semble avoir un effet bénéfique sur des pathologies inflammatoires. Compte tenu de ces observations, la compréhension des mécanismes liant l'apport calorique et l'inflammation intestinale est importante.

Notre étude consiste d'une part à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires hypercaloriques ou hypocaloriques, d'autre part à identifier les mécanismes cellulaires et physiopathologiques responsables de la modulation de la sévérité de l'inflammation. Compte tenu des différences entre homme et femme au niveau de la physiologie du stockage et de l'utilisation des composés énergétiques, nous prévoyons d'étudier parallèlement des souris mâles et femelles.

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

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car l'étude porte sur un régime alimentaire et la nutrition fait intervenir des processus physiologiques complexes qui interagissent.
2. Réduction : l'étude portera sur des souris mâles de laboratoire, réparties en 4 groupes d'études selon leur régime alimentaire : régime témoin et régime hyperglucidique. Chaque groupe sera subdivisé en deux sous-groupes : traités ou non traités avec l'agent colitogène (DSS). Ainsi, 20 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (régime spécial, traitement pro-inflammatoire, coloscopie) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal et les coloscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids de plus de 20%, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biologiques.

13527 Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Le lupus est une maladie chronique auto-immune, qui survient lorsque le système immunitaire s'attaque aux cellules de l'organisme et les détruit. Il peut toucher de nombreuses parties du corps, dont les articulations, la peau, les reins, le cœur, etc. C'est la raison pour laquelle on parle de lupus disséminé ou « systémique ». Le lupus peut causer des symptômes aussi différents que des poussées de fièvre inexplicables, des douleurs et un gonflement des articulations, des troubles de la vision et bien d'autres. Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De nombreux traitements sont utilisés afin de prévenir le développement de la pathologie tels que les corticoïdes ou les immunosuppresseurs ainsi que les anticorps monoclonaux anti-CD20. Seulement, l'effet de ces molécules n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés sera de 560 souris (réparties dans 2 modèles différents) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher.

13528 La cryptosporidiose est une maladie parasitaire intestinale à prévalence cosmopolite et responsable de diarrhées chez les individus immunodéprimés et les jeunes. Zoonose mal contrôlée, elle affecte la santé humaine et animale. Sa transmission est assurée de manière oro-fécale, suite à la

contamination de denrées alimentaires ou eaux de boisson par les fèces d'un individu contaminé. Chez les animaux de production, elle conduit à des pertes économiques importantes ainsi qu'à des problèmes sanitaires et environnementaux. Les cibles les plus sensibles sont les jeunes ruminants (veaux, agneaux, chevreaux) en raison de l'immaturation de leur système immunitaire intestinal. Cette pathologie atteint également la notion de bien-être animal, provoquant symptômes digestifs, déshydratation, retard de développement et peut conduire à la mort de l'animal selon la sévérité des manifestations cliniques précédentes.

La présente demande s'inscrit dans un projet de Recherche fondamentale visant à élucider les mécanismes immunitaires conduisant à la protection contre cette maladie chez les jeunes ruminants. La cryptosporidiose survenant dans les jours qui suivent la naissance, l'immunité innée joue un rôle important pour limiter l'infection chez ces sujets naïfs ; en effet, il n'y a pas de passage transplacentaire des anticorps maternels chez les ruminants et les anticorps du colostrum ne suffisent pas à protéger le nouveau-né. L'objectif du projet est d'identifier les cellules de l'immunité innée impliquées dans la réponse précoce au parasite, de déterminer leur cinétique de recrutement et leur éventuelle interaction. Nous disposons de données en modèle murin mettant en évidence le rôle de certains sous-types de cellules phagocytaires mononucléés dans le contrôle de la phase aiguë de l'infection. Le système immunitaire présentant des particularités propres à l'espèce et les réponses pouvant différer de façon importante, il est pertinent de vérifier si ces résultats peuvent être transposés aux ruminants et plus particulièrement aux agneaux. L'espèce ovine a été choisie car elle est très sensible à l'infection et l'accès aux jeunes animaux est facilité grâce aux élevages ovins de proximité.

Ce projet s'inscrit dans la dynamique de respect de la règle des 3 R en expérimentation animale :

- Réduire : Le plan expérimental (nombre d'animaux par lot, nombre de lots expérimentaux, répétition des expérimentations) a été établi de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en s'assurant de l'exploitabilité et de la significativité des résultats

- Raffiner : Les agneaux seront infectés par le parasite *Cryptosporidium parvum* par voie orale et une surveillance clinique quotidienne ainsi que des mesures non invasives de paramètres biologiques (température, poids) seront assurées. Un enrichissement de l'hébergement adapté à l'espèce a été prévu et les critères du point limite ont été définis. Les prélèvements sur animal vivant se limiteront à des prises de sang et récolte de fèces, puis les prélèvements d'intestin et d'organes immunitaires seront faits après euthanasie.

- Remplacer : Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle *in vivo* étant donné la complexité de la mise en place des réponses immunitaires et des interactions cellulaires.

Le nombre d'animaux est estimé à 90 pour les 5 ans (6 animaux/lot x 3 lots/expérimentations x 1 expérimentation/an x 5 ans).

13529 Des résultats obtenus par divers laboratoires ont montré que la flore intestinale avait un rôle fondamental dans le développement du système immunitaire. Au sein de notre laboratoire, nous avons démontré son rôle clé dans la croissance tumorale et l'efficacité de traitements contre le cancer. En effet, ces résultats ont montré que certaines bactéries de la flore intestinale permettent d'induire une réponse immunitaire qui limite la croissance tumorale. De plus, les chimiothérapies et immunothérapies connues pour activer le système immunitaire nécessitent certaines bactéries de la flore pour être efficaces contre la tumeur. Nos premiers résultats obtenus dans un modèle de tumeur spontanée de neuroblastome montrent que le microbiote intestinal maternel est impliqué dans l'oncogenèse chez le souriceau et dans l'éducation et le développement de son système immunitaire.

Notre objectif est d'analyser les mécanismes par lesquels le microbiote maternel influence le système immunitaire anté- et néo-natal, le métabolisme et enfin, la croissance tumorale.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans sa globalité l'impact de l'environnement maternel lors de la gestation sur l'immunité naturelle de la descendance et l'immunité anti-tumorale dans un

contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*.

Pour cela, chez des souris immunodéficientes, nous effectuerons des transferts adoptifs de cellules immunitaires d'intérêt et étudierons leurs effets sur la croissance tumorale. Ces expérimentations vont nous permettre de tester notre hypothèse du rôle joué par certaines sous-populations immunitaires sur la croissance du neuroblastome. En parallèle, chez des souris immunocompétentes, nous étudierons par quels mécanismes le microbiote intestinal maternel modifie le système immunitaire du souriceau ainsi que le développement tumoral.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Les contraintes pour les animaux seront essentiellement représentées par des greffes de tumeurs en sous-cutanée, et des protocoles d'éradication de la flore bactérienne par des mélanges d'antibiotiques.

Réduction du nombre: les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques.

Réduction de la contrainte et optimisation: Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant du bien-être animal en réduisant au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux lors des procédures par des suivis cliniques précis et quotidiens et en ayant recours à l'anesthésie pour toutes les procédures expérimentales.

Le projet nécessitera 3091 souris. Ce nombre d'animaux se justifie par les différents protocoles de décontamination et types de cellules tumorales utilisés.

13530 La ceftriaxone est un des antibiotiques fréquemment utilisé en pratique clinique pour traiter les infections pulmonaires et urinaires. La durée de l'utilisation de cet antibiotique chez les patients dépend du foyer infectieux traité et excède rarement une quinzaine de jours.

Par ailleurs il a été démontré que la ceftriaxone était un inhibiteur compétitif des exonucléases de la superfamille des metallo-bêta-lactamases. ARTEMIS est une protéine qui fait partie de cette famille et est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules, et intervient dans la réparation de l'ADN et le développement de la réponse immunitaire. Il a par ailleurs été montré que la mutation de la protéine ARTEMIS était responsable de déficit immunitaire combiné sévère (blocage de la maturation des lymphocytes B et T) chez l'homme et chez la souris.

De plus, chez l'homme, le traitement par ceftriaxone pendant plus de 3 jours est un facteur de risque de Candidémies. La question qui se pose est de savoir si la ceftriaxone en inhibant l'activité de l'exonucléase ARTEMIS peut induire un déficit immunitaire sévère et ce de façon transitoire.

Nous proposons donc d'étudier ici en utilisant un modèle murin, l'impact de la ceftriaxone sur la réponse immunitaire en regardant d'une part si cet antibiotique modifie la réponse anticorps (réponse IgG et IgM) à la toxine tétanique, et d'autre part en regardant si la ceftriaxone favorise les infections fongiques.

L'utilisation de l'animal est la seule alternative pour étudier la réponse humorale. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, rate, poumons, ...).

Nous mettons en œuvre des mesures d'acclimatation en zone d'hébergement d'une semaine avant de commencer les manipulations. Les animaux seront hébergés en cages collectives et un enrichissement sera assuré par l'ajout des igloos et de matériel de nidification. Les animaux seront suivis par le même expérimentateur et surveillés quotidiennement même les jours fériés.

240 souris seront nécessaires pour la réalisation de ce projet. Ce projet sera réalisé dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3.

Par ailleurs, pour limiter toute souffrance et/ou l'angoisse des animaux, ce projet respectera la règle des 3 R, réduire, raffiner et remplacer. Réduire car nous avons choisi le nombre minimal d'animaux (10 par groupes) pour observer une différence statistiquement significative. Nous avons centré et

focalisé le projet sur les deux expériences essentielles qui nous permettront d'affirmer ou d'infirmier notre hypothèse. Raffiner puisque nous avons défini des points limites afin de détecter les souffrances animales, points au-delà desquels, les souris seront euthanasiées afin d'abrèger les souffrances. Après injection intrapéritonéale, en cas de signe de douleurs (prostration, poils hérissés, anorexie) une analgésie par paracétamol sera administrée par voie orale. Remplacer car nous avons réalisé une partie de l'expérimentation *in vitro*, mais également *in silico*. L'euthanasie sera effectuée par une injection IP de dolethal (100 mg/kg) dès l'apparition du point limite.

13531 De nombreuses études chez l'homme et chez l'animal ont montré qu'un apport excessif en chlorure de sodium (sel) est un facteur de risque aggravant les conséquences de l'hypertension ou du diabète. La restriction sodée est souvent proposée à ces patients permettant notamment d'en limiter les atteintes cardiovasculaires. De plus, il a été récemment montré que le fonctionnement normal des vaisseaux dans la peau est aboli par la charge en sel. Par exemple, leur capacité à se dilater est particulièrement altéré lors d'une surcharge en sel. Cette altération vasculaire est également observée chez les patients diabétiques ou ayant un syndrome métabolique. Elle expliquerait l'apparition d'escarres et de plaies chroniques qui ont des difficultés à se résorber chez ces patients. Le projet aura pour but d'évaluer le bénéfice de la restriction en NaCl sur la réactivité neurovasculaire cutanée et plus particulièrement dans un modèle animal de diabète insulino-résistant. Un régime obésogène est connu pour provoquer une insulino résistance sera donné à des souris. Pour une partie des souris, le régime sera en plus restreint en sel. Nous étudierons la capacité des vaisseaux sanguins de leur peau à se dilater lors de l'utilisation de plusieurs stimuli mécaniques et pharmacologiques. Si un bénéfice du régime restreint en sodium est avéré, nous étudierons également la capacité de cicatrisation de ces souris qui est très dépendant de l'intégrité de la microvascularisation cutanée.

L'exploration fonctionnelle de la réactivité neurovasculaire nécessite une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet concernera 600 souris au maximum.

13532 Introduction : La peau est le plus grand organe du corps et remplit de nombreuses fonctions. Cet organe comporte des cellules souches impliquées dans la régénération cutanée. Ces cellules souches contribuent également à la réparation de la plaie, ce qui permet de restaurer l'intégrité et la fonction des tissus endommagés. Les processus de cicatrisation infructueux conduisent souvent à des plaies qui ne guérissent pas. Les traitements actuels des plaies chroniques étant limités, la recherche de meilleures stratégies thérapeutiques est en cours. Parmi celles-ci, la greffe de cellules souches est apparue comme une alternative prometteuse. Cependant celles-ci étant souvent d'origine embryonnaire, leur utilisation est complexe.

Les recherches se sont alors portées sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Leur production consiste à prélever pratiquement n'importe quelle cellule chez un adulte et à la reprogrammer génétiquement pour la rendre pluripotente, c'est à dire capable de se multiplier à l'infini et de se différencier en un type de cellules donné.

Objectif du projet:

Dans ce projet, on se propose, non pas d'utiliser les iPSC proprement dit, mais un extrait acellulaire de ces iPSC. L'effet de cet extrait sera évalué sur sa capacité à induire un processus de renouvellement cellulaire après injection intradermique chez le lapin. Le suivi de ce renouvellement cellulaire sera réalisé par une analyse de l'expression de biomarqueurs impliqués dans ce processus, la production de collagène et une observation histologique de la peau. Ce projet sera réalisé dans un modèle sain. Les résultats obtenus permettront de définir de l'intérêt ou non à poursuivre la documentation dans un modèle de cicatrisation et fera l'objet d'un autre PEA.

Avantages:

Les cellules souches iPSC sont une promesse de la médecine régénérative. Elles sont en cours de tests dans plusieurs essais cliniques. Cependant, les mutations qui surviennent dans ces cellules au cours de leur génération font craindre de potentiels problèmes chez les patients transplantés, en particulier des risques de tumeurs malignes.

L'avantage de ce projet est l'utilisation d'un extrait acellulaire, qui plus est dépourvu de facteurs de transfection exogènes.

Ainsi cette approche permet de s'affranchir du potentiel risque associé à l'utilisation des iPSC tout en conservant les propriétés régénératrices qui devraient contribuer à l'amélioration et l'accélération de la cicatrisation, particulièrement dans le cas de brûlures. In fine, ce traitement pourrait se substituer aux traitements actuels, généralement longs et d'efficacité moyenne.

Dommages escomptés:

A ce jour, aucun rapport n'a démontré l'utilisation d'extraits d'iPSC dans la cicatrisation des plaies cutanées et on en sait peu sur leurs mécanismes sous-jacents dans la réparation des tissus.

Cependant et afin d'anticiper des dommages éventuels liés à l'injection de ces extraits de cellules souches, des points limites précis ont été établis et serviront à garantir le bien être optimal de l'animal.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de cicatrisation dans un organisme entier.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

- Choix des espèces / Méthode de raffinement :

Le lapin permet l'injection intra dermique de volume jusqu'à 100µl et de multiplier les sites d'injection grâce à une surface cutanée importante au niveau du dos. Ceci permet de diminuer le nombre d'animaux et contribue au raffinement des études.

-Nombre d'animaux :

Sur une période de 5 ans, 1550 animaux maximum seront nécessaires à l'évaluation de cette thérapie dont 25 pour la formation et le maintien des compétences aux gestes techniques.

-Conditions d'hébergement et de soins: Les conditions d'hébergement et de soins utilisés ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes. Les animaux sont hébergés en cage individuelle, tout en gardant un contact visuel et olfactif avec leurs congénères. Ce milieu environnemental pourra être amélioré, par un enrichissement adapté pour leur permettre de s'occuper et d'exprimer des comportements spécifiques de l'espèce, par exemple, des blocs à ronger et des plateformes pour se placer en hauteur.

Avant chaque étude, une période d'acclimatation, d'au moins 7 jours, sera appliquée ; Période durant laquelle les animaux seront visités chaque jour, afin qu'ils s'habituent à la présence humaine et appréhendent les différents gestes et situations qu'ils seront amenés à vivre pendant l'étude.

Afin de s'assurer du bien-être animal sur la durée de l'expérimentation, des points limites ont été définis. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés, en fonction de la sévérité de la douleur, en appliquant des protocoles analgésiques pré établis.

13533 Contexte :

La maladie de Newcastle est une maladie présente partout dans le monde, très contagieuse et souvent grave, qui affecte les oiseaux, notamment les volailles domestiques.

La maladie de Newcastle est visée par le Code sanitaire pour les animaux terrestres de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et compte parmi les maladies à déclaration

obligatoire. En France la plupart des dindes en production sont régulièrement vaccinées contre la maladie de Newcastle à l'aide de différents types de vaccins.

Objectifs :

L'objectif de ce projet est d'administrer différents vaccins commerciaux poulets contre la maladie de Newcastle qui n'ont pas d'autorisation de mise sur le marché chez l'espèce dinde et d'apporter des données scientifiques afin d'étudier l'innocuité et la prise vaccinale sur le long terme.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être de l'inconfort, du stress et une gêne liée aux administrations du vaccin et aux prélèvements répétés.

Informations sur les espèces utilisées :

Les études de ce projet seront réalisées sur l'espèce dinde au plus proche des conditions réelles du terrain. Jusqu'à 360 dindes seront utilisées sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs

Remplacement : Seules les études *in vivo* permettent de confirmer l'activité du vaccin et c'est important de tester le vaccin dans des conditions qui se rapprochent des conditions réelles d'utilisation.

Réduction : Les effectifs des animaux sont calculés au plus juste afin d'utiliser le nombre minimal pour garantir l'atteinte de l'objectif du projet.

Raffinement : des points limites spécifiques à l'espèce dinde et un suivi adapté sont mis en place afin de prendre en charge les animaux le plus rapidement et efficacement possible lors d'éventuelles réactions secondaires liées à l'injection du vaccin ou liées à des maladies naturelles. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour garantir leur confort et leur bien-être.

13534 Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme, après ceux de la prostate et du poumon. Ce cancer constitue la deuxième cause de décès par cancer en France. Il représente près de 12 % de l'ensemble des décès par cancer, en particulier chez les 65 ans et plus. En France, on recense près de 40 000 nouveaux cas chaque année. La mortalité diminue régulièrement cependant le taux de survie à 5 ans des personnes souffrant de ce cancer n'est pas encore total puisqu'il est de 63%.

L'objectif de l'étude est de définir la pertinence d'une stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation d'un anticorps dans le traitement de tumeurs et de définir les mécanismes moléculaires d'action de cette stratégie. En effet cette approche est basée sur le ciblage d'une molécule afin de réactiver la mort des cellules cancéreuses. Etant donné qu'il est décrit que 80% des cancers du côlon surexpriment la molécule d'intérêt, cette étude porte sur des lignées de cancer colorectal. Il a été montré *in vitro* que ces lignées meurent après traitement avec l'anticorps. Les mécanismes d'action de l'anticorps ont, également, été déterminés *in vitro*. Il est maintenant important de confirmer les effets anti-tumoraux de cet anticorps *in vivo* afin de tenir compte du microenvironnement tumoral.

Dans ce projet qui durera 5 ans, au maximum 520 souris seront utilisées et réparties dans 3 procédures. La première procédure permettra d'étudier l'effet anti-tumoral d'un anticorps et ses mécanismes moléculaires ; pour cela les souris seront greffées en sous-cutané avec 4 lignées cellulaires de colon et traitées par voie intra-tumorale avec l'anticorps. La deuxième procédure est une étude pilote pour identifier le pouvoir métastatique de ces 4 lignées cellulaires, les cellules seront injectées par voie intraveineuse et la dissémination dans les poumons sera suivie par imagerie. Enfin, la troisième procédure étudiera sur les 2 lignées ayant le pouvoir métastatique le plus élevé, l'effet de l'anticorps sur le développement de métastases grâce à un suivi par imagerie. Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés par cage de 5 individus.

L'administration d'anesthésique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

Un suivi longitudinal par imagerie de la progression des métastases permet une réduction du nombre de souris. La réalisation séquentielle des expérimentations permet de réduire le nombre de souris, en effet la procédure 3 sera réalisée si et seulement si l'étude pilote est concluante.

A l'issue de ce projet, si le traitement par l'anticorps induit une régression tumorale ainsi qu'une diminution des métastases ; ceci devrait donc conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient avoir une efficacité sur divers types de cancers.

13535 Nous cherchons à limiter les effets du stress social prénatal sur les porcelets, en leur proposant des situations sources d'émotions positives que peuvent être les interactions avec une personne. Le stress gestationnel a un effet négatif sur l'état émotionnel des jeunes, leurs capacités d'adaptation à des stress. Il est possible d'améliorer ceci par des expériences post-natales positives chez le jeune. L'impact positif des interactions humaines de type caresses, parole douce, sur le bien-être et le développement du jeune a été mis en évidence dans de nombreuses études. Nous voulons voir s'il permet de moduler les effets délétères du stress prénatal chez les porcelets.

Pour cela, 4 groupes de 18 truies gestantes seront soumis à une restriction du temps d'accès à l'alimentation. Nous mesurerons l'activité comportementale et le taux de cortisol salivaire pour évaluer leur stress. Quelques jours avant la mise bas, les quatre truies les plus stressées et les quatre truies les moins stressées de chaque groupe seront sélectionnées pour suivre leur comportement maternel, les performances de reproduction et le comportement de leurs porcelets (total de 32 truies). Nous mesurerons le tempérament des porcelets à deux semaines d'âge. Au sevrage, 6 porcelets par portée seront suivis pendant 5 semaines. La moitié sera apprivoisée par des contacts positifs répétés chaque jour (parole, caresses) pendant 2 semaines et l'autre non. Nous observerons alors l'impact de cette relation à l'humain positive sur le comportement des jeunes. Au total, 72 truies seront observées en gestation, les portées de 32 d'entre elles, puis 192 porcelets après le sevrage.

Nous porterons particulièrement attention au respect des 3R dans ce projet. La notion de remplacement a été réfléchié mais il n'est pas possible à ce jour de modéliser le stress prénatal et la relation à l'homme, c'est pour cela que nous travaillerons avec des animaux. Le nombre de traitements et d'animaux a été choisi dans un objectif de réduction, afin d'être sûr d'attendre un nombre de 16 mâles et 16 femelles par lot, nous permettant de tirer des conclusions en s'affranchissant de la variabilité individuelle et en mesurant l'effet du sexe. Enfin, le raffinement sera assuré aussi bien pendant l'élevage (présence d'objets à manipuler, suivi régulier de la consommation d'aliment et du comportement) que lors des tests comportementaux qui peuvent induire un stress passager du fait de l'isolement social. Tout au long du projet, les animaux seront suivis quotidiennement au moment des repas par les personnes en charge de l'expérience ou les animaliers formés pour l'expérimentation animale. Tout animal souffrant sera soigné en fonction de son état, selon les recommandations vétérinaires.

13536 Beaucoup de progrès ont été réalisés dans le domaine de cicatrisation cutanée et le traitement des grands brûlés. Cependant, ces derniers souffrent souvent d'altérations sensorielles (de la sensation du toucher, de la température et douleur) sur les zones soignées/greffées. Ces atteintes ont une répercussion importante sur la qualité de vie des patients. A l'heure actuelle, nous ignorons les mécanismes cellulaires impliqués sur la ré-innervation. Ce projet a donc pour but d'étudier ceux-ci et de conforter notre hypothèse de la nécessité d'avoir une composante neuronale dans le mécanisme de régénération tissulaire.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi la souris comme modèle (modèle pertinent reconnu dans la communauté scientifique) qui permet d'obtenir des résultats fiables en évitant utilisation de singes ou de chiens (remplacement). La procédure expérimentale consistera à venir greffer sur le dos de la souris nude (lignée prédisposée à la greffe) anesthésiées différents échantillons de peaux humaines et de suivre la progression de la cicatrisation sur une durée de 3 mois. Plus précisément, les échantillons de peau se présentent sous la forme de biopsie circulaire de peau humaine saine et reconstruite. Pour cette études 3 groupes seront formés (1) condition contrôle, biopsies de peau humaine. (2) Condition PR, peau reconstruite (3) PRN, peau reconstruite + cellules nerveuses. Pour

chaque condition 4 lots différents seront constitués correspondant au temps avant sacrifice (1) 2 semaines, (2) 1 mois, (3) 2 mois et (4) 3 mois. Chaque lot sera constitué de 6 individus. Soit pour chaque condition $6 + 6 + 6 + 6 = 24$ individus que l'on multiplie par 3 pour les Trois conditions pour avoir le nombre final de 72. Ce nombre a été réduit au minimum sans diminuer la qualité des résultats. Cette réduction a été rendu possible en regroupant par individu 2 analyses (réduction). Le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs est donc de 72 souris pour l'ensemble de l'étude et 10 animaux surnuméraires seront commandés, pour compenser d'éventuelles exclusions liées à des événements imprévus, soit nombre total d'animaux pour ce projet de 82 souris. Dès leur réception, les souris seront placées dans des cages à portoir ventilé dans lesquelles un enrichissement du milieu de stabulation sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement). Le comportement des souris sera observé quotidiennement et les animaux seront pesés de manière hebdomadaire. Afin de limiter la douleur post-opératoire de la buprénorphine à une dose de 0.2mg/kg, soit environ 190 µl pour une souris de 28 g avec une solution de 30 µg/ml, sera administrée par voie intra-péritonéale, 2 fois par jour) et de l'acétaminophène sera ajoutée à l'eau de boisson durant 72h. Ces analgésiques seront également administrés si l'animal présente une douleur (raffinement).

13537 L'objectif de ce projet est de montrer l'intérêt d'associer un médicament utilisé en cardiologie, la trinitrine, avec des chimiothérapies peu efficaces dans le cas du cancer du côlon. Le but est de comprendre les mécanismes responsables de cet effet anti-tumoral et le rôle joué par les cellules immunitaires.

Cette étude fait suite à de précédant travaux montrant une potentielle capacité de la trinitrine à augmenter l'effet anti-tumoral de chimiothérapies n'activant pas le système immunitaire lorsqu'elles sont utilisées seules. La compréhension de ces mécanismes pourrait conduire à l'utilisation de nouvelles associations thérapeutiques en cancérologie.

Remplacement : Ces travaux ne peuvent pas être réalisés sur des cellules en culture ou à partir de méthodes alternatives puisque ce traitement nécessite la présence du système immunitaire, d'où l'utilisation de souris immunocompétentes.

Ce projet qui va durer 5 ans nécessite l'utilisation de 960 souris Balb/C, 240 souris C57Bl/6, 90 souris nude (déficientes en lymphocytes T) réparties comme suit :

(1) L'étude de l'efficacité anti-tumorale de l'association de la trinitrine à des chimiothérapies induisant ou non l'activation du système immunitaire nécessite l'utilisation de 240 souris Balb/C, 240 souris C57Bl/6 et 90 souris nude qui seront réparties en groupes de 5 souris. L'activité anti-tumorale de cinq chimiothérapies n'induisant pas le système immunitaire et deux chimiothérapies l'induisant sera testée dans deux modèles de souris (Balb/C et C57Bl/6) porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique. L'implication du système immunitaire sera démontrée par utilisation de deux chimiothérapies, n'activant pas le système immunitaire, associées à la trinitrine dans un modèle de souris nude porteuses de tumeurs.

(2) L'étude du mécanisme anti-tumoral induit par ces traitements nécessite 720 souris Balb/C, qui seront réparties en groupes de 5 souris. L'activité anti-tumorale de deux chimiothérapies n'induisant pas le système immunitaire et une chimiothérapie l'induisant sera testée dans le modèle de souris Balb/C porteuses de tumeurs sous-cutanées d'origine colique à partir de cellules CT26 modifiées pour exprimer la forme mutée ou contrôle de 3 protéines cibles.

Réduction : Pour obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs toutes ces expériences réalisées sur des groupes réduits à 5 souris, devront être réalisées trois fois, comme nous l'ont démontrées les précédentes études.

Raffinement : L'hébergement des souris se fera en groupe pour éviter le stress et du matériel d'enrichissement permettant la construction de nid sera fourni. Les lignées de cellules tumorales murines seront injectées dans le flan de souris anesthésiées, par voie sous-cutanée. Les différents traitements seront administrés par voie intrapéritonéale, intraveineuse et sous-cutanée. Les animaux seront suivis tous les 2-3 jours pour vérifier leur bien-être et déterminer la progression tumorale par mesure du volume de la tumeur. En cas d'apparition de nécrose les tumeurs seront

traitées avec une crème cicatrisante, si la nécrose dépasse 2 mm de diamètre ou si la taille de la tumeur dépasse 2000 mm³ ou si d'autres signes de souffrance apparaissent (ex : perte de 20% du poids de la souris), les animaux seront mis à mort.

13538 La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative dont l'évolution est progressive, et qui reste à l'heure actuelle incurable. Cette pathologie est la plus importante des maladies neurodégénératives après la maladie d'Alzheimer à travers le monde. Dans les pays industrialisés, la MP touche 0.3% de la population totale, 1-3 % des personnes âgées de plus de 65 ans et chaque année, 8 à 18 personnes sur 100 000 développent cette pathologie.

A l'heure actuelle, l'origine de cette pathologie n'est pas encore identifiée, de nombreux travaux de recherche ont pu mettre en évidence deux formes de la maladie, une forme familiale et une forme sporadique (qui se développe chez des patients sans prédisposition apparente). La forme familiale, d'origine génétique, commence très précocement entre 20 et 50 ans et représente 5% des patients. La forme sporadique atteint des patients plus tardivement vers 60 ans et concerne 95% des malades touchés par la MP. Néanmoins ces deux formes présentent les mêmes altérations motrices : le tremblement au repos, la bradykinésie/akinésie (ralentissement du mouvement, ou inhibition totale du mouvement), la rigidité et l'instabilité posturale.

Ces symptômes moteurs sont provoqués par la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc), une structure cérébrale impliquée dans le contrôle moteur de la fluidité des mouvements via ces connexions vers une autre structure, le striatum. Il est important de noter que les symptômes non-moteur comme la perte de l'odorat, les troubles du sommeil, les dysfonctionnement gastro-intestinaux, les déficits cognitifs et émotionnels, sont également des symptômes cliniques majeurs de la MP.

Une protéine nommée alpha-synucléine a été identifiée comme étant un des facteurs pouvant mener à l'apparition de la MP. Cette protéine peut prendre plusieurs formes. Sous une forme particulière, elle est connue pour être toxique pour une population de neurones très impliquée dans la MP. En plus elle est capable de modifier la forme d'autres protéines d'alpha-synucléine, les rendant toxiques à leur tour. Cette contamination de proche en proche entraîne la propagation progressive de la forme toxique dans de nombreuses régions du cerveau.

Les traitements mis en place pour la prise en charge de la pathologie sont des traitements symptomatologiques : qu'ils soient pharmacologiques en visant le rétablissement des niveaux de dopamine cérébrale, chirurgical en mimant via un stimulateur de l'activité des circuits neuronaux impliqués ou encore cellulaire en tentant de rétablir des cellules produisant de la dopamine. Ces traitements ne modifient pas la progression de la maladie mais masquent néanmoins les symptômes en améliorant la qualité de vie des patients.

Afin de développer de nouveaux traitements efficaces contre la MP, l'utilisation de modèles animaux adéquats et pertinents restent indispensables. En effet, pendant plusieurs décennies, seuls des modèles utilisant des composés chimiques permettant d'obtenir une lésion rapide et massive des neurones dopaminergiques ont permis d'identifier des cibles permettant de soulager la souffrance des patients. Aujourd'hui, le défi est de développer des traitements permettant d'enrayer la pathologie. La mise en place d'un modèle de MP induit par l'injection intracérébrale (ic) d'ASO est un bon outil pour le screening de produits à visée thérapeutique.

Notre projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de 60 produits sur les altérations comportementales et tissulaires induites par l'administration intracérébrale d'ASO chez la souris (procédure 1). L'administration des produits testés sera effectuée soit par voie intranasale, soit par voie intrapéritonéale, soit par voie orale (procédure 2), selon le type de produits et de cibles thérapeutiques. Pour évaluer les effets moteurs et mnésiques des produits, après l'administration intracérébrale d'ASO, les animaux réaliseront des tests mesurant leurs performances de motricité fine des pattes antérieures (procédure 3 : test de retrait de ruban adhésif collé sur la face interne des poignets : adhésive removal test ; procédure 4 : test d'habileté à manger un spaghetti : Vermicelli handling test), de coordination sensorimotrice (test du franchissement de la barre :

procédure 5). Les animaux réaliseront également des tests de mémoires : labyrinthe en y (procédure 6) et le test de reconnaissance d'objet (procédure 7).

Ce suivi sera réalisé au maximum sur trois mois après l'administration des ASO.

Au maximum 1560 souris mâles C57BL6J âgées de 10 semaines à leur arrivée seront utilisées dans ce projet, sur 5 ans.

Les animaux seront hébergés à 3 par cage, en cycle de lumière inversé, pour observer leur comportement à la suite des traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et avec un enrichissement de la cage (raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et en cas d'atteinte d'un des points limites fixés (perte de poids, agressivité, cachexie, vocalises, infection post-opératoire), ils seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Dans notre projet, nous avons veillé à pouvoir réduire au maximum les animaux tout en gardant une bonne sensibilité statistique si cela était possible (réduction). Nous veillerons à la réduction de facteurs environnementaux induisant des variabilités dans les résultats pour assurer une très bonne reproductibilité des expériences (réduction du stress, prise en charge de la douleur post-opératoire) (raffinement). La modélisation de la MP à ce niveau complexe d'intégration ne peut à l'heure actuelle être modélisé *in vitro* ou *in silico* (remplacement).

13539 Les entérobactéries sont fréquemment responsables d'infections communautaires ou nosocomiales. Elles sont généralement traitées par des bêta-lactamines, mais au cours des deux dernières décennies, on observe une augmentation importante de la résistance des entérobactéries à ces antibiotiques, en particulier *Escherichia coli*.

Face à l'augmentation continue des résistances bactériennes, il est indispensable de développer de nouvelles thérapeutiques complémentaires ou alternatives à l'antibiothérapie. L'utilisation de phages (phagothérapie) pourrait être l'une de ces alternatives. La phagothérapie est déjà utilisée chez l'homme dans les pays de l'Est comme la Russie et la Géorgie. Elle consiste en l'injection de phages entraînant une lyse des bactéries.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité *in vivo* d'un nouveau bactériophage dans un modèle de sepsis à *E. coli* chez la souris.

Pour cela, 328 souris Swiss femelles vont être utilisées.

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

- Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'un bactériophage sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

- Réduire : Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite. Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

- Raffiner :

- Avant l'expérimentation :

- o Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes, enrichies de frisstis. La litière est changée une fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

- o Détermination des points limites : figure 6, annexe 1.

- Pendant l'expérimentation :

- o Evaluation des signes généraux : Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

- o Procédures : Les procédures d'infection sont réalisées sous anesthésie générale.

o Euthanasie : dislocation cervicale après pré anesthésie par inhalation d'isoflurane.
Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

13540 Objectif du projet :

La maladie de Huntington (HD) est une maladie héréditaire et orpheline, qui se traduit par une dégénérescence neurologique provoquant d'importants troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques, et évoluant jusqu'à la perte d'autonomie puis la mort. Cette maladie neurodégénérative est d'origine génétique. Les chromosomes, support du patrimoine génétique, sont composés d'ADN et de protéines. Les gènes sont des fragments d'ADN. Chaque gène, lorsqu'il est connu et identifié, est localisé précisément sur un chromosome. La maladie de Huntington est due à une mutation d'un gène nommé IT15 et situé sur le chromosome 4. La molécule d'ADN est constituée de quatre bases (qui constituent l'alphabet du code génétique), à savoir A(adénine), T(thymine), G(guanine), et C(cytosine). Le gène responsable de la maladie de Huntington possède une région dans laquelle une séquence de trois bases (CAG) est répétée de nombreuses fois. Le gène muté comporte une augmentation du nombre de ces répétitions. Ce gène porte l'information pour la fabrication d'une protéine, la huntingtine, dont la fonction normale est inconnue à ce jour, même si l'on sait qu'elle a un rôle protecteur sur le cerveau. La mutation responsable rend toxique la protéine huntingtine mutée. Celle-ci forme des agrégats dans les neurones du noyau caudé et putamen, et ultérieurement le cortex cérébral.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier l'efficacité de composés en développement sur les altérations du fonctionnement neuronal qui sous-tendent la HD. Pour ce projet, nous utiliserons des souris transgéniques, modèles de la maladie. Les modifications du réseau neuronal induites par l'administration unique ou répétée de composés en développement par voie entérale (orale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire) seront évaluées sur ces souris, après la période d'administration, par des enregistrements électrophysiologiques sur coupes cérébrales.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 5050 souris.

Avantages :

Ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie *ex vivo* (sur coupes cérébrales) permettra de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement sur les modifications du réseau neuronal liées à la HD. La technique utilisée sera l'électrophysiologie *ex vivo*, c'est-à-dire sur coupes cérébrales. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones ou de neurones isolés.

Domages escomptés :

Les modèles de souris transgéniques que nous utiliserons présentent un phénotype dommageable mais ne nécessitent pas de conditions d'hébergement ou d'enrichissement spécifiques. Leur bien-être sera attentivement suivi durant toute la durée du projet grâce à des fiches d'observation/points limites. Suite à l'administration des composés à tester, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Dans ce cas, les points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) :

L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations sont réalisées chez la souris, car il existe de nombreux modèles transgéniques associés à la HD, utilisés communément par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés. Ces rongeurs, de petite taille et

d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

-réduction : le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique de base, activité neuronale). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Dès que l'administration des composés débutera, une observation journalière des animaux sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée et selon les points limites définis.

13541 Objectifs du projet :

La finalité de ce projet de recherche transversal consiste à caractériser l'action de nouveaux composés pharmacologiques, dans le but de protéger ou de réparer la gaine de myéline et les fibres nerveuses dans le cadre de pathologies démyélinisantes, telles que la sclérose en plaques.

La preuve de concept a été obtenue avec deux candidats médicaments, ce qui a permis de développer 60 nouveaux composés qui ont fait l'objet d'un dépôt d'un brevet. Des études *in vitro* sont en cours afin de caractériser plus précisément certaines propriétés essentielles lors d'une utilisation thérapeutique. Il demeure toutefois qu'aucun de ces modèles n'intègre encore toutes les dimensions et tous les déterminants potentiels d'un organisme sain ou malade. Cette étude nécessite donc l'addition d'analyses effectuées *in vivo*, dans un modèle animal présentant une démyélinisation du système nerveux central (SNC) bien caractérisée. Le modèle de démyélinisation toxique par la cuprizone est bien décrit dans la littérature et maîtrisé par notre structure de recherche. La démyélinisation est obtenue par une modification du régime alimentaire des animaux qui ne présentent pas de signes cliniques. Elle est réversible et observable grâce à des techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) sous anesthésie gazeuse, permettant un suivi longitudinal sans sacrifice de l'animal. Nous désirons affiner et valider les paramètres d'acquisition IRM et définir une grille de lecture clinique permettant de suivre l'évolution de chaque animal et de valider chaque point stratégique du modèle. Dans un second temps, l'impact des deux composés ayant permis d'avancer notre preuve de concept et pour lesquels nous détenons de nombreuses données *in vitro* et *in vivo* sera entreprise. Les analyses IRM seront incrémentées d'études immunohistochimiques afin de déterminer plus précisément les types cellulaires impliqués. Dans un troisième temps, nous exploiterons les données *in vitro* et *in vivo* obtenues grâce aux deux premières procédures afin d'optimiser l'étude de l'impact de deux molécules innovantes dans le cadre d'un projet collaboratif avec un partenaire privé (valorisation et exploitation du brevet).

Nombre et type d'animaux utilisés :

Cette étude préclinique sera réalisée sur un modèle animal utilisant des souris mâles de souche C57BL/6. Trois procédures expérimentales, découlant les unes des autres, seront effectuées. La première procédure expérimentale permet de définir une grille de lecture clinique du modèle, d'affiner et de valider les paramètres d'acquisition et de traitement des données IRM (42 animaux).

La seconde procédure expérimentale permet d'affiner la procédure thérapeutique grâce à l'utilisation des deux composés bien caractérisés *in vitro* et *in vivo* et ayant permis de développer notre preuve de concept, dans les quatre stades du développement de la pathologie (1460 animaux). La troisième procédure permettra de recueillir des données objectives dans un modèle biologique intégré et de déterminer l'impact de deux molécules innovantes sur la destruction ou la réparation de la gaine de myéline et des fibres nerveuses (240 animaux).

1742 animaux seront donc nécessaires pour mener à bien ce projet. Le nombre de sujets nécessaires correspond au nombre minimal d'animaux permettant une interprétation sans ambiguïté de nos résultats.

Démonstration de la conformité aux 3Rs :

Remplacer : Les composés pharmacologiques étudiés dans ce projet font tous l'objet d'études *in vitro* (pharmacocinétique et toxicologie cellulaire) préalables aux analyses *in vivo*. Ces résultats permettront de sélectionner les deux molécules innovantes les plus pertinentes parmi les 60 nouveaux composés présents dans le brevet. Les données *in vitro* et *in vivo* que nous détenons déjà pour les composés ayant permis d'avancer notre preuve de concept ont été prise en compte lors de la conception des procédures.

Réduire : La recherche d'une grille de lecture clinique permettra de parfaire le suivi de l'évolution de chaque individu. L'utilisation de techniques IRM nous permettra de suivre les modifications présentes au sein du SNC durant 12 semaines, sans sacrifice. Notre plan d'expériences imbriquées permettra de limiter le nombre d'individus. Un grand nombre d'animaux sera sacrifié durant la seconde procédure expérimentale afin de valider un seul protocole d'administration et deux fenêtres thérapeutiques. Les données des animaux témoins seront réutilisées.

Raffiner : Le modèle de démyélinisation est maîtrisé par notre équipe et répandu dans les laboratoires étudiant la physiopathologie des phénomènes de démyélinisants/remyélinisants. Les points d'analyses nécessitant une euthanasie ont été clairement définis grâce à la bibliographie. Leur pertinence pour chaque animal sera attestée par l'utilisation d'une grille de lecture clinique affinées et d'un suivi IRM longitudinal.

13542 Pour lutter contre la dégradation de l'état des milieux aquatiques, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE), établit un cadre communautaire pour les pays membres de l'Union Européenne dans un objectif de meilleure gestion des milieux aquatiques. La DCE définit des règles communes pour mettre fin à la détérioration de la qualité des eaux et parvenir à atteindre un bon état général de l'ensemble des eaux de surface (rivières, lacs, eaux côtières) et souterraines d'ici 2027. Pour y parvenir, il est donc nécessaire de statuer sur l'état chimique et écologique des masses d'eau. Cependant, les analyses chimiques ne sont pas exhaustives et ne renseignent pas sur l'exposition réelle des organismes à l'ensemble des molécules présentes. De plus, même si la définition de l'état écologique informe sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques associés à cette masse d'eau, elle souffre d'un manque de prédictivité

Dans un double objectif d'obtenir des indicateurs plus prédictifs et intégrateurs de l'action des molécules chimiques sur les organismes vivants, les biomarqueurs apparaissent comme des outils pertinents pour compléter la démarche imposée dans la DCE. Cependant, la disparition de l'espèce sentinelle en cas de contamination ou l'absence d'une espèce d'intérêt en écotoxicologie sur le site d'étude limitent encore l'utilisation de ces outils. La biosurveillance active, c'est-à-dire l'encagement d'individus provenant d'un élevage, apparaît alors comme une alternative pertinente pour étudier une contamination environnementale. L'encagement permet alors d'exposer à une pollution environnementale des organismes dont les antécédents sont bien connus et ainsi de s'affranchir de la variabilité engendrée par les adaptations génétiques des populations. L'encagement permet également de standardiser plusieurs paramètres biotiques (taille, sexe, âge, etc...) et abiotiques (nombre d'individus, temps d'exposition, distance par rapport à la source, etc...). De plus, dans le contexte actuel de préservation des milieux et de maintien de la biodiversité, l'encagement permet de ne pas prélever d'individus dans les populations naturelles et ainsi de limiter l'empreinte écologique de la biosurveillance. Cette technique est de plus en plus utilisée sur différents types

d'organismes tels que les bivalves, les crustacés et les poissons. Chez les poissons, parmi les nombreuses espèces sentinelles pouvant être utilisées en biosurveillance active, la biologie, le comportement et l'écologie de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) sont particulièrement bien documentés. C'est une espèce euryhaline assez ubiquiste, avec des populations établies dans de nombreux milieux européens (littoral, estuaire, rivières, lacs). Sa petite taille (4 à 8 cm à l'âge adulte), sa facilité de manipulation et d'élevage ainsi que sa résistance aux contaminants environnementaux en font une espèce d'intérêt en biosurveillance active.

L'objectif de ce projet est d'utiliser cette approche de biosurveillance active chez l'épinoche dans différents contextes de pollution (pesticides, STEP, rejets industriels, etc.) seule ou en complément des outils mis en œuvre dans le cadre de la DCE de façon à affiner le diagnostic environnemental et à préciser l'apport de ces outils dans le suivi réglementaire des masses d'eau. D'un point de vue pratique, la procédure consiste à encager 30 individus par site d'étude durant une période variant de 1 à 6 semaines en fonction du contexte environnemental. En effet, des études préliminaires ont permis de montrer que 30 individus par site étaient suffisants pour permettre une bonne caractérisation des effets potentiellement induits. Une trentaine de sites par an seront étudiés ce qui correspond à 4500 poissons pour la totalité de l'étude.

En ce qui concerne la réduction du nombre d'animaux, l'ensemble des paramètres biologiques est mesuré sur chaque individu, ce qui permet de minimiser le nombre de poissons utilisés. Le nombre d'individus par groupe est optimisé de façon à permettre une détection significative des variables mesurées (test de puissance). Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement des animaux sont enrichies pour favoriser leur bien être (hébergement en groupe, décors des aquariums, mise à disposition de caches). Avant encagement sur les sites d'étude, les conditions physico-chimiques des sites sélectionnés seront mesurées (pH, conductivité, oxygénation, et température) afin d'acclimater à ces conditions les animaux en laboratoire. Pendant cette acclimatation, les animaux sont observés quotidiennement en se référant à la grille d'évaluation des points limites chez les poissons en application dans notre laboratoire et l'acclimatation sera immédiatement arrêtée si nécessaire. Ces sites seront alors éliminés de l'étude puisqu'incompatibles avec de bonnes conditions de vie des épinoches. Sur le terrain, les cages ne seront déposées sur un site que dans des zones compatibles avec les conditions de vie de l'épinoche (bord de rivière, ombragée, courant faible, bonne oxygénation...). Le nombre de poisson par cage est adapté afin de ne pas dépasser une densité de 2,31 g/L n'induisant aucune lésion visible ni perturbation des variables biologiques mesurées. Pour ce qui est du remplacement, il n'existe pas d'alternative à l'utilisation animale pour la validation d'une batterie de biomarqueurs dans une perspective d'évaluation des effets chroniques d'une contamination des milieux aquatiques sur les poissons.

13543 L'antibiorésistance est devenue un problème majeur, tant en termes de santé humaine qu'animale, avec l'émergence et la diffusion croissante de souches de bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques.

Certaines émergences conduisent à des impasses thérapeutiques ou à des situations dramatiques dans le traitement de certaines infections graves. En France, le taux de résistance aux antibiotiques est de 50 % pour la pénicilline et de 28 % pour la méticilline utilisées respectivement contre le pneumocoque et le staphylocoque doré, qui constituent les principales bactéries à l'origine des infections nosocomiales.

Les entérobactéries sont également fréquemment responsables d'infections communautaires ou nosocomiales. Elles sont généralement traitées par des bêta-lactamines, mais au cours des deux dernières décennies, on observe une augmentation importante de la résistance des entérobactéries à ces antibiotiques, en particulier *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

Face à l'augmentation continue des résistances bactériennes, il apparaît donc indispensable de développer de nouvelles thérapeutiques complémentaires ou alternatives à l'antibiothérapie.

Le produit que nous allons tester est le nicotinamide mononucléotide (NMN). Cette molécule est naturellement produite par l'homme. Elle est déjà utilisée dans d'autres indications (stress oxydant,

obésité) et sans aucun effet secondaire observé chez l'homme. Son effet sur l'immunité est pour l'instant extrêmement novateur et peu étudié. Ce booster de l'immunité permettrait de stimuler le système immunitaire afin de le rendre plus réactif et plus efficace face aux pathogènes.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité *in vivo* d'une nouvelle molécule agissant sur l'immunité dans un modèle de pneumopathie à *E. coli* et *Staphylococcus aureus* chez la souris.

Pour cela, 528 souris Swiss femelles vont être utilisées.

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

- Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

- Réduire : Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite. Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

- Raffiner :

- Avant l'expérimentation :

- o Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes, enrichies de frisottis. La litière est changée une fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

- o Détermination des points limites : figure 6, annexe 1.

- Pendant l'expérimentation :

- o Soins pré et postopératoire : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,05mg/kg) 30minutes avant les injections intratrachéales.

- o Evaluation des signes généraux : Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

- o Procédures : Les procédures d'infection et de traitement intra trachéal sont réalisées sous anesthésie générale.

- o Euthanasie : dislocation cervicale après pré anesthésie par inhalation d'isoflurane.

Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

13544 L'atrésie de l'oesophage est une malformation congénitale qui consiste à une interruption de la continuité œsophagienne pour laquelle une intervention chirurgicale est nécessaire à la naissance. Dix à 15% de ces patients présentent une forme avec une anastomose impossible à la naissance à cause de la grande taille du defect qui sépare les deux culs de sac œsophagiens. Des techniques de remplacement œsophagien par des transplants gastriques, intestinaux ou coliques font partie de l'arsenal thérapeutique mais les résultats à long terme sont assez décevants. L'ingénierie tissulaire est un nouvel espoir pour cette malformation car en effet la reconstruction par l'oesophage natif reste la meilleure des thérapeutiques. La reconstruction partielle de l'oesophage chez le petit animal par un tissu créé par ingénierie tissulaire a été mise au point par l'équipe qui a déjà l'expérience de ce type de reconstruction au niveau de la trachée. Néanmoins, la tolérance du greffon à long terme et son aspect fonctionnel n'ont pas été évalués.

Le but de ce projet est de mettre en place une étude pilote afin de vérifier la faisabilité de cette technique sur un modèle porcin, ce qui permettrait d'obtenir un modèle expérimental plus proche de l'Homme et permettant une évaluation fonctionnelle plus adaptée avant un passage à l'application clinique. L'étude pilote serait réalisée sur 8 minipig. L'implant œsophagien est préparé à partir de cellules autologuesensemencées sur une matrice acellulaire avant d'être implanté dans l'épiploon pour obtenir une vascularisation de support. Dans un deuxième temps, ce transplant vascularisé est utilisé en remplacement du bas œsophage par une deuxième intervention sous couvert d'une endoprothèse œsophagienne. Le respect des 3R ne permet pas d'envisager de

remplacement puisque l'objectif est de valider de façon préclinique la technique chirurgicale sur un modèle de gros mammifère.

Afin de réduire le nombre d'animaux, le projet de suivi à grande échelle nécessite la validation de la technique par cette étude pilote. Compte tenu des complications éventuelles de ce type d'interventions, on estime que 8 animaux sont nécessaires pour obtenir au moins 6 observations analysables permettant de juger de la reproductibilité de la technique. En guise de raffinement, les animaux seront suivis quotidiennement et leur état général post opératoire évalué. En fin de procédure et avant la mise à mort ; les organes non utilisés seront proposés aux autres équipes sur le site. Dans le cadre de cette étude pilote, on estime que 6 succès chirurgicaux sont nécessaires pour valider le concept technique et réaliser d'éventuels ajustements techniques. Dès ce nombre atteint, l'étude est interrompue même si l'ensemble des animaux prévus n'ont pas été opérés. Les résultats attendus sont l'obtention d'un remplacement d'un segment œsophagien fonctionnel permettant l'autonomie alimentaire des animaux par voie orale. La durée de suivi est de 6 mois dans cette étude préliminaire.

13545 La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) est une forme extrêmement grave d'hypertension pulmonaire (HTP), qui survient suite à l'occlusion progressive du lit capillaire et veineux des poumons (la partie du lit vasculaire pulmonaire qui transporte le sang oxygéné). En réponse à l'augmentation des résistances à l'écoulement du sang au travers du poumon, le ventricule droit (VD), dont la fonction est justement de pomper le sang vers les poumons pour qu'il s'oxygène, s'hypertrophie puis défaille rapidement. Il n'y a pas de traitement approuvé pour la MVOP, et ce sous-groupe d'HTP est caractérisé par un mauvais pronostic et la possibilité de développer des œdèmes pulmonaires sévères induits par les traitements spécifiques de l'hypertension artérielle pulmonaire (ou HTAP, une forme très proche et plus fréquente d'HTP qui touche plus les artères pulmonaires que les veines pulmonaires). La transplantation pulmonaire reste la seule thérapie pour les patients éligibles.

Suite à l'observation que les chimiothérapies peuvent induire la MVOP, et en particulier les traitements à base de mitomycine C (MMC), il a été montré que l'exposition d'animaux et en particulier de rats, à la MMC permettait de reproduire fidèlement la maladie humaine. Il a ensuite été montré que l'exposition des rats à la MMC représentait le 1er modèle pré-clinique pertinent de MVOP pour tester des candidats médicaments innovants pour cette maladie orpheline.

Le défibrotide (defitelio) est un médicament indiqué pour le traitement de la maladie veino-occlusive hépatique (MVOH) sévère. La MVOP et la MVOH étant deux pathologies du lit vasculaire veineux, et se déclenchant toutes les deux dans un contexte de chimiothérapie, nous posons l'hypothèse que le défibrotide pourrait constituer un traitement de la MVOP. D'ailleurs, il a été démontré que le défibrotide possède des vertus cytoprotective, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et activatrice de la voie des prostacyclines, qui appuient d'avantage la pertinence de son utilisation dans la MVOP.

Le but de ce projet est de tester le potentiel préventif et curatif du défibrotide dans le modèle de MVOP induite chez le rat par la MMC. Les études *in vitro* ont montré que le défibrotide réduit la mort cellulaire des cellules vasculaires pulmonaires ce qui augure bien de son efficacité dans ce modèle. Cependant l'issue thérapeutique (diminution de l'insuffisance cardiaque droite) doit être confirmée *in vivo* avant d'envisager son utilisation chez l'homme.

Avant de tester le défibrotide chez les patients atteints de MVOP, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de cette molécule sur un modèle animal. Concernant les maladies cardiovasculaires, le modèle animal le plus approprié est le modèle rat (*Rattus norvegicus*). Cette étude nécessitera l'utilisation de 157 rats. La quantité d'animaux utilisée a été calculée statistiquement afin d'être réduite à son minimum. Afin d'améliorer le bien-être des animaux, les cages seront enrichies avec différents ustensiles adaptés au mode de vie des rats. Les méthodologies employées tiennent compte de la notion de points limites et définissent des critères d'interruption d'expérimentation et toutes possibilités de méthodes alternatives (effet du défibrotide sur cellules humaines et animales) ont été prises en compte.

L'utilisation d'animaux dans ce projet s'inscrit donc dans le besoin vital d'identifier un médicament pour une maladie orpheline mortelle pour laquelle il n'existe aucun traitement autorisé.

13546 Le système nerveux central est constitué de neurones et de cellules gliales. Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent les neurones. Pourtant depuis une vingtaine d'année de plus en plus d'études indiquent que les glies présentes en nombre égale avec les neurones dans le système nerveux central sont également impliquées dans les fonctions mnésiques et cognitives.

La pharmacopée développée jusqu'alors est essentiellement orientée vers les fonctions neuronales et les effets sur les cellules gliales des molécules les plus couramment utilisées pour le traitement des maladies neurologiques sont inconnus. Le but de ce projet est d'étudier les interactions entre la glie et les neurones et de mieux comprendre les voies de signalisation impactées par l'usage de psychotropes. Nous étudierons l'effet de ces psychotropes sur un modèle de souris transgénique nous permettant de visualiser les cellules gliales. Les mouvements des prolongements de certaines cellules gliales seront étudiés par microscopie sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules gliales nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent lors des traitements psychotropes et de mieux comprendre le rôle des cellules gliales dans les mécanismes de mémoire et de cognition et de troubles cérébraux d'ordre psychiatriques.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés a été établi sur la base de notre expérience du modèle et des statistiques afin d'utiliser un minimum de souris tout en pouvant conclure statistiquement. Chaque animal sera son propre témoin ce qui diminue le nombre d'animaux nécessaires, et pour chaque traitement le nombre d'animaux utilisés sera restreint dès la significativité des résultats (52 souris maximum).

L'étude des cellules gliales impose des conditions physiologiques et une absence d'inflammation ce qui nous contraint à l'utilisation d'un modèle *in vivo*. Une fois les voies de signalisations identifiées, l'étude des mécanismes sera réalisée *in vitro* (Remplacer et Réduire). Il est à noter que ce modèle peu invasif ne semble pas induire de stress ou de souffrance des souris. Néanmoins, nous veillerons à limiter le mal être des animaux par un enrichissement de leurs conditions de vie, en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. En complément, le bien-être des animaux sera évalué de façon quotidienne (posture, poids, toilettage).

Ce type d'étude se faisait jusqu'à présent essentiellement sur des modèles primate non-humains. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu durant les sollicitations sensori-motrices.

Les résultats obtenus dans cette étude permettront de mieux comprendre la pharmacopée actuelle et les effets qui leurs sont associés tout en comprenant le rôle des cellules gliales dans les mécanismes de mémoire et de cognition.

13547 L'amyotrophie spinale est une maladie neurodégénérative très sévère caractérisée par la dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral entraînant une faiblesse et une hypotonie généralisée des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 naissance sur 10 000, n'a aucun traitement et est la première cause de mortalité infantile liée à une maladie génétique. Elle est due à des mutations dans le gène SMN1 qui code pour une protéine de survie du motoneurone, la SMN. Il existe 5 formes cliniques de la maladie selon le degré de sévérité (amyotrophie spinale de type 0, I à IV, de la plus grave à la moins sévère).

Afin de réaliser des essais thérapeutiques pré-cliniques, nous allons utiliser le modèle murin Smn2B/- : ce modèle est atteint d'une amyotrophie spinale moins sévère (type II) et une durée de vie relative allongée par rapport à d'autres (souris, cochons, chats) qui ont tous une pathologie plus sévère et une durée de vie très limitée. Notre projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour l'amyotrophie spinale en apportant, à l'aide de vecteurs AAV (dérivés de virus associés à l'adénovirus), le gène humain SMN1 chez le modèle murin Smn2B/-.

La stratégie d'expérimentation consiste en trois procédures :

- 1) Génération d'un modèle murin d'amyotrophie spinale Smn2B/-.
- 2) Sélection d'un vecteur de thérapie génique chez des souris C57Bl/6.
- 3) Administration d'un vecteur de thérapie génique chez le modèle animal d'amyotrophie spinale Smn2B/-.

Afin de prendre en compte le bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant la règle des 3 R :

-Réduction : certaines souris issues des croisements mais ne présentant pas de pathologie seront utilisées pour les croisements nécessaires au maintien de l'élevage. L'amyotrophie spinale affecte indifféremment les hommes et les femmes : des souris des deux sexes seront donc utilisées. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par groupe, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistiques prédictive (test de comparaison des moyennes).

-Remplacement : il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude de cette pathologie, car bien que des modèles cellulaires de motoneurons déficients en SMN existent, ils ne permettent pas d'étudier certains défauts fonctionnels majeurs de la pathologie, tels que la dégénérescence de la jonction neuromusculaire, évènement précoce essentiel dans la progression de la pathologie. A l'opposé, le modèle murin utilisé ici reproduit avec fidélité l'ensemble des symptômes (dégénérescence neuronale, faiblesse musculaire, réduction de l'espérance de vie) et nous permettra de suivre l'évolution de la maladie après le traitement.

-Raffinement : pour la sélection du vecteur de thérapie génique, nous allons utiliser des souris C57Bl/6 (procédure n°2). Pour les souris malades présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de leur en faciliter l'accès (procédures n°3).

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 868 souris.

13548 Le muscle strié squelettique est composé de fibres musculaires qui doivent s'adapter aux changements physiologiques et environnementaux tout au long de la vie. Il a aussi la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches satellites. Les cellules satellites sont responsables de la régénération des fibres musculaires après une lésion, que celle-ci soit d'origine traumatique ou génétique (dystrophie musculaire). Des pathologies comme les myopathies, le vieillissement ou un exercice physique trop intense conduisent à un stade chronique d'activation de la régénération avec un épuisement des cellules satellites, aboutissant ainsi à une diminution de la capacité régénérative. Le projet vise à comprendre comment les cellules satellites répondent aux signaux d'activation lors de la régénération. L'identification de ces mécanismes de régulation pourrait permettre l'établissement de stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la régénération musculaire dans des contextes pathologiques affectant le muscle.

Ce projet mobilisera 1623 souris. Une lésion musculaire locale sera réalisée après injection d'une toxine dans le muscle de la patte chez la souris anesthésiée. D'après nos études antérieures, les animaux présentent un comportement et une activité normale après l'injection dès leur réveil. La régénération musculaire sera étudiée dans un modèle de souris, ce qui permettra d'identifier le processus biologique mis en place pour cette régénération. Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3 R sont:

- Remplacement: Des expériences utilisant des cellules musculaires de laboratoire ont déjà été réalisées et des résultats ont été obtenus. Pour confirmer et étudier la physiologie de la régénération musculaire nous devons utiliser l'animal entier.

- Réduction: Nous utiliserons le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus, des banques biologiques issues des expérimentations sont gérées de façon commune afin d'y recourir et limiter l'utilisation de nouveaux animaux. Elles permettent notamment les études histologiques et les cultures cellulaires pour plusieurs analyses différentes. Autant que faire se peut, des prélèvements multiples sont réalisés après mise à mort sur le même individu pour des tests parallèles.

- Raffinement: les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques sont utilisés pendant les expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris.

13549 La myéline est une gaine essentielle à la fois pour l'isolation et la protection de chaque nerf du système nerveux central et périphérique. Tout défaut de myéline est associé à des pathologies dites neuropathies. Parmi les neuropathies périphériques les plus connues, on peut citer la maladie de Charcot-MARie-Tooth. A l'heure actuelle, les causes de ces défauts de méyline sont souvent inconnues et les traitements curatifs inexistantes. Afin de mieux comprendre les causes et pouvoir trouver de nouvelles solutions thérapeutiques, nous nous intéressons à une protéine identifiée chez la souris et/ou le poisson zèbre, appelée *Adcy6*. De manière intéressante, chez l'Homme, cette dernière est responsable dans un cas d'arthrogrypose congénitale héréditaire (raideur des articulations, plus communément appelée immobilité foetale) associé à un défaut de myélinisation du système nerveux périphérique par les cellules de Schwann, cellules responsables de la myélinisation.

L'arthrogrypose est une maladie musculaire et articulaire avec une atteinte de l'intégrité des axones, suite à leur non myélinisation. Ce phénotype a été visualisé chez l'Homme. Les multiples tissus impactés et l'interaction entre différents types de cellules impliquées dans la mise en place du système nerveux périphérique est donc nécessaire pour faire cette étude et nécessite donc un organisme entier mammifère. Aucun système cellulaire *ex vivo* ne peut rendre compte de la physiologie du développement qui fait intervenir interactions cellulaires, molécules informatives (hormones, cytokines). De plus, le KO du gène *Adcy6* dans une lignée de cellules spécifiques (système Cre lox) indispensable pour nos études, n'est possible que chez le rongeur. L'avantage du modèle souris est que le contexte physiologique (hormones, nutriment, oxygénation) est respecté et permettra de suivre le développement de la pathologie humaine. Aucun autre modèle mammifère n'est aussi adapté à l'étude d'un tissu/organe en développement. L'objectif principal du projet est donc d'évaluer l'impact de la perte neuronale d'*Acy6* chez la souris à la naissance et durant ses premières semaines de développement (jour 1, 4, 10, et 21). Nous allons donc analyser la formation du nerf sciatique comme nerf de référence par différentes techniques biologiques.

La règle des 3 R sera appliquée le long de ce programme de recherche. Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures. Cette étude sera menée en parallèle d'un modèle de poisson zèbre et de culture de cellules (à partir des tissus prélevés) afin de remplacer et/ou réduire au maximum le nombre des souris, tester des produits pharmacologiques et orienter au mieux les expériences sur le nerf sciatique. De plus, le nombre d'animaux sera réduit à 6 par point expérimental, le minimum requis lors de nos travaux précédents de façon à mettre en évidence des différences statistiques avec un risque d'erreur moins que 5%. La méthodologie expérimentale est optimisée pour utiliser le strict nécessaire d'animaux, appartenant à la même lignée puisqu'un même animal servira à 2 analyses. Un hébergement adapté, une surveillance quotidienne et la mise en place de points limites contribueront au RAFFINEMENT. Le nombre total d'animaux qui seront utilisés dans ce projet est de 177 souris.

13550 La myéline est une gaine qui protège et isole les fibres nerveuses et qui permet la propagation de l'influx nerveux à grande vitesse.

Les phagocytes sont des cellules immunitaires capables de capturer des micro-organismes ou des débris cellulaires et de les éliminer (phagocytose).

Lorsqu'il y a une démyélinisation, les phagocytes éliminent les débris de myéline et exportent le cholestérol du cerveau grâce à des transporteurs (notamment ApoE2). Au cours du vieillissement, les phagocytes ne sont plus en mesure d'éliminer tous ces débris. Cela provoque l'accumulation d'un taux excessif de débris de myéline conduisant à la formation de cristaux de cholestérol (le principal composant de la myéline). Cette accumulation peut surcharger la capacité de transport de cholestérol des phagocytes, formant ainsi un goulot d'étranglement pour une réparation réussie dans le système nerveux central (SNC).

L'objectif de ce projet est donc de proposer une thérapie visant à diminuer la quantité de cholestérol dans le cerveau. Dans ce but, il y a deux voies possibles:

1/Améliorer le transport du cholestérol en excès

2/Moduler la production du cholestérol dans le cerveau.

Pour cela, des cellules souches hématopoïétiques (CSH) seront modifiées *ex vivo* à l'aide d'un vecteur lentiviral. Ces CSH ont la capacité d'arriver dans le cerveau et de se différencier *in vivo* en cellules microgliales pouvant sécréter les molécules d'intérêt et permettre ainsi l'élimination du cholestérol en excès pour finalement aider à la remyélinisation.

Remplacement : nous souhaitons utiliser un modèle animal car aucun modèle in-vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier la complexité des mécanismes neuronaux. Le modèle souris a été choisi et permettra d'évaluer le potentiel de cette thérapie pour la réparation de la myéline.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur ou d'inconfort, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, après consultation du concepteur et du vétérinaire. Si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction : enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques fiables. En effet, des travaux précédents ont permis de montrer que l'étude de groupes de 15 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs en comportement, ainsi que dans les analyses biochimiques et de biologie moléculaire, réalisées sur de petits échantillons (1 hippocampe / souris). Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 620 souris.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des établissements reconnus. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

13551 L'hypertension artérielle est une des maladies les plus fréquentes dans les pays occidentaux. A titre d'exemple, on comptait en France 12 millions de patients hypertendus en 2008. Cette maladie est dite complexe car elle est due à la fois à des facteurs environnementaux et génétiques. Si une alimentation riche en sel est reconnue depuis plusieurs années comme une des causes majeures d'hypertension, les mécanismes responsables de cette sensibilité au sel de la pression artérielle restent encore mal compris. Une des stratégies d'étude fréquemment utilisées pour comprendre les maladies fréquentes et complexes telles que l'hypertension est l'analyse génétique de syndromes rares et monogéniques, c'est-à-dire causées par une mutation dans un seul gène. L'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (FHHT) est une forme rare d'hypertension humaine. L'étude de ce syndrome s'est révélée passionnante puisqu'elle a permis l'identification de 4 nouveaux régulateurs de la pression artérielle, à savoir les kinases WNK1 et WNK4 et les protéines Cul3 et KLHL3, qui stimulent la dégradation des kinases WNKs, inhibant ainsi leur activité. Lors de la découverte des mutations de ces gènes chez les patients atteints de FHHT, aucune donnée de la littérature ne permettait d'expliquer comment ces mutations peuvent conduire au développement de ce syndrome. Nous avons donc développé plusieurs modèles de souris afin d'identifier les mécanismes mis en jeu par ces différentes protéines pour réguler la balance du sel et donc la pression artérielle. Des modèles animaux sont absolument nécessaires à ces études car le rein, organe responsable du maintien de la balance du sel, est un tissu complexe, composé de plusieurs types cellulaires qui travaillent de concert sous l'influence de nombreuses hormones et facteurs extracellulaires tels que la concentration en sel. Il est donc très difficile voire impossible de reproduire fidèlement l'ensemble de ces interactions *in vitro*, dans des modèles de cellules isolées.

Les techniques utilisés sont la caractérisation du bilan du sel dans des cages dites métaboliques, des prélèvements sanguins pour mesurer la concentration en sel, la mesure de la pression artérielle et l'injection de molécules anti-hypertensives identiques à celles utilisées chez les patients. Le nombre maximal de souris nécessaires à la conduite de ce projet de 5 ans est évalué à 792.

Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à respecter la règle des 3R, en réduisant au maximum l'utilisation des animaux, notamment en utilisant les animaux pour

plusieurs procédures. Le bien-être des animaux est assuré par une surveillance quotidienne et le recours à des analgésiques quand c'est nécessaire.

13552 Le projet va consister à développer de nouvelles approches d'immunothérapie curative ou préventive dans les modèles du cancer du sein et du poumon. Cette approche est basée sur l'utilisation d'antigènes tumoraux spécifiques (ATS) qui vont permettre de stimuler les composantes du système immunitaire et de provoquer une réponse dirigée contre les cellules tumorales. Nous utiliserons des ATS qui permettant d'induire chez l'animal la production de lymphocytes T cytotoxiques capables de détruire les cellules tumorales sans altérer les tissus normaux.

Ces approches d'immunothérapie seront testées sur des modèles murins de cancer du sein et du poumon. Ces deux modèles largement décrits dans la littérature utilisent des cellules cancéreuses murines implantés par voie sous-cutanée. Ces deux modèles sont des modèles métastatiques capables de migrer du site d'injection vers différents organes avec le développement d'important foyers au niveau pulmonaire.

Les ATS seront testés *in vivo* chez la souris, permettant d'évaluer l'effet anti-tumorale tout en explorant l'ensemble des composantes cellulaires du système immunitaire. L'utilisation d'une technique d'imagerie va permettre de quantifier précisément la croissance tumorale ainsi que les foyers métastatiques.

Pour le modèle du cancer du sein les cellules cancéreuses seront greffées au niveau des mamelons chez les souris. Pour ce modèle il s'agira de déterminer dans un premier temps la dose minimale capable de générer une tumeur et la dose permettant d'obtenir un nombre suffisant et quantifiable de métastases pulmonaires après avoir injecté les cellules par voie sous-cutanée. Les ATS seront testés tout d'abord en préventif puis en curatif. L'efficacité du traitement sera évaluée par la mesure de taille de tumeur greffée et par l'imagerie. Pour le modèle du cancer du poumon les mêmes compositions d'AST seront utilisées que pour le modèle du cancer du sein. Pour ce modèle il s'agira de déterminer dans un premier temps la dose tumorigène et la dose permettant d'obtenir un nombre suffisant et quantifiable de métastases pulmonaires après avoir injecté les cellules par voie sous-cutanée. Seuls des modèles murins pourront évaluer l'efficacité thérapeutique de nos approches immunothérapeutiques nécessitant l'activation des Lymphocytes T cytotoxiques par le thymus et les foyers secondaires comme la rate et les ganglions. Nos approches ne provoqueront aucun dommage pour les souris comparées à l'utilisation d'une chimiothérapie ou une radiothérapie connue pour causer des dommages graves aux souris traitées par ces approches. Le nombre total de souris sera de 848.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Chaque fois que cela est possible nous allons privilégier des expériences *in vitro* sur des cellules afin de remplacer les expériences sur l'animal. Toutes interventions et administrations sur l'animal se feront sous anesthésie générale ou locale. Nous avons aussi amélioré les techniques opératoires permettant d'éviter et/ou de réduire la souffrance et le stress de l'animal en utilisant des techniques d'imagerie par bioluminescence par un dispositif de type IVIS Spectrum. Ce dispositif permettra d'obtenir des résultats de meilleure qualité qui n'auront pas à être répétés et de réduire de façon notable le nombre d'animaux utilisés, et de réduire la pénibilité des expériences réalisées.

Aussi nous avons planifié de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en utilisant des lots d'AST homogènes ou en utilisant un animal comme son propre témoin, permettant ainsi de réduire la variabilité interindividuelle et donc la taille du lot à étudier.

L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien.

L'expérimentation animale reste irremplaçable pour pouvoir tester des produits d'immunothérapie contre le cancer. Nous serons très vigilants et ferons en sorte de réduire au mieux l'expérimentation animale en utilisant des approches de culture cellulaire quand cela sera possible. Nos projets permettront de proposer et de valider de nouvelles approches d'immunothérapie en testant de

nouveaux AST uniques et jamais testés auparavant par d'autres équipes dans le monde. Nos approches d'immunothérapie anti-cancéreuses apporteront de nouvelles armes thérapeutiques pour traiter des cancers du sein et du poumon pour des patients résistant aux traitements conventionnels. Nos objectifs sont de valider de nouvelles approches thérapeutiques visant à augmenter la survie des patients atteints de cancers encore difficilement soignables. Grâce à l'expérimentation animale, principalement sur la souris, les taux de survie des cancers sont exponentiels à nos jours. Par exemple, l'Herceptine (une protéine de souris humanisée) a contribué à augmenter le taux de survie pour le cancer du sein, cela n'aurait pas pu être possible sans la recherche animale sur des modèles expérimentaux sur souris. Le développement du Tamoxifène en utilisant des animaux a conduit à une baisse de 30% du taux de mortalité des patients atteints du cancer du sein. La recherche animale également contribué au développement des vaccins contre le Papillomavirus humain responsable du Cancer du col de l'Utérus.

13553 La chlordécone est un insecticide qui a été utilisé dans les bananeraies des Antilles françaises, il est interdit depuis plus de 20 ans mais est encore présent dans les sols. Cette molécule est un polluant organique persistant qui peut être transféré dans la chaîne alimentaire. La question qui se pose est celle du maintien de l'élevage dans les zones contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier des carcasses de ruminants dont les teneurs en polluants dépassaient les LMR les rendant impropres à la consommation.

La chlordécone est connue pour être métabolisée en chlordécol chez certaines espèces. Une étude récente (2018) a mis en évidence la présence de ce métabolite chez le porc. L'apparition de métabolites de la molécule mère et leur excrétion constituent des voies d'élimination de la chlordécone. Comprendre les mécanismes d'élimination du chlordécol permet de mieux comprendre le devenir de la chlordécone chez le porc et de compléter les données sériques et fécales de toxicocinétique de la chlordécone existantes chez le porc. 4 porcs mâles castrés en croissance seront utilisés pour l'étude envisagée. Ainsi, du chlordécol sera administré par voie intraveineuse via un cathéter jugulaire. Des prélèvements de sang et de fèces seront ensuite effectués dans les 3 jours suivant l'injection sur la seconde jugulaire cathétérisée. Une mise à mort réglementaire sera effectuée sur les 4 porcs à 72h afin de permettre des prélèvements de bile et de contenus digestifs.

Remplacement : pour obtenir ces informations, aucun remplacement n'est envisageable pour ce type d'étude. Les données collectées serviront à la construction d'un modèle compartimental de transfert de la chlordécone à l'échelle de l'animal et permettront de calculer finement les sorties de chlordécone de l'animal.

Réduction : Le nombre d'animaux sera limité au maximum pour des raisons d'éthique. Un nombre de répétitions de 4 apparaît cependant nécessaire et suffisant pour s'assurer de la puissance statistique nécessaire (sur la base de l'expérience antérieure de l'équipe de recherche en terme d'écart-type résiduels prévisibles pour les porcs et la sensibilité analytique du dosage de la chlordécone et de son métabolite).

Raffinement : Les animaux seront placés en logement collectif conformément à la réglementation, sauf à partir de la mise en place des cathéters jugulaires pour éviter les risques d'arrachement de cathéters soit sur une période de dix jours. Cependant afin d'assurer un maximum de bien-être aux animaux, les contacts visuel, auditif et olfactif seront préservés. Des éléments d'enrichissement du milieu seront ajoutés dans les boxes.

Points limites : Compte-tenu des interventions envisagées une surveillance régulière sera nécessaire. Lors de celles ci, des comportements d'inconfort (prostration, refus de nourriture, vocalisation) seront relevés. Par ailleurs, une évaluation de la douleur sera réalisée

quotidiennement sur le comportement de l'animal. On considèrera que toute chute de poids de plus de 10% entre deux pesées (une pesée ayant lieu une à deux fois par semaine) impliquera un protocole de soin ou une mise à mort en cas d'abattement profond.

13554 La maîtrise du moment de l'ovulation permet d'optimiser l'insémination des poulinières et représente un intérêt économique important pour les éleveurs. Cependant à l'heure actuelle les éleveurs ne possèdent qu'un faible nombre de molécules capables d'induire l'ovulation. De plus ces molécules ne donnent pas des résultats terrain complètement satisfaisants. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules plus performantes représente un intérêt majeur pour la filière équine. Les résultats d'études précédentes tendent à montrer que le beta Nerve Growth Factor (NGF) et le C6 (analogue de la kisspeptine) seraient de bons candidats pour la maîtrise de l'ovulation chez les animaux de rente. Notre objectif est de déterminer si ces molécules sont efficaces chez l'espèce équine via l'étude des réponses neuroendocriniennes provoquées par leur injection. Nous utiliserons seize (16) ponettes Welsh qui seront réparties en un lot de huit (8) pour le NGF et un autre lot de huit pour le C6. L'expérimentation sera faite selon deux périodes : saison sexuelle et anoestrus saisonnier. Deux voies d'administration, voie intra-musculaire (IM) et voie sous-cutanée, (SC), seront testées. Pour chaque molécule testée, les ponettes seront leur propre témoin et seront utilisées selon quatre modalités (saison et voie d'administration).

La réalisation de ce protocole se fera dans le respect des 3R.

Remplacer : A présent il nous est impossible de répondre à ces questions avec des approches *in vitro*. Les réponses neuroendocriniennes sont, par définition, associées à des phénomènes biologiques complexes non reproductibles en dehors de l'organisme.

Réduire : Pour réduire au maximum le nombre d'individus utilisés nous avons fait le choix d'utiliser un protocole expérimental qui permet d'utiliser le même animal pour effectuer le traitement et le contrôle.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales (paille et foin de qualité, soins quotidiens) sur leur lieu d'élevage et ils seront également répartis en groupe ce qui permet le respect du comportement grégaire de l'espèce équine. La procédure de cathétérisme intra veineux est réalisée sous anesthésie locale et les prélèvements sont effectués par du personnel qualifié et spécifiquement formé.

13555 Pour prévenir les accidents vasculaires cérébraux ou les thromboses veineuses, de nombreux patients à travers le monde sont traités avec des anticoagulants. Le risque pour ces patients est de vivre un épisode de saignement interne important qu'il est difficile de traiter ou de prévenir lors d'une chirurgie d'urgence. Développer des médicaments pouvant restaurer l'hémostase chez des patients traités avec un anticoagulant est un enjeu médical important pour intervenir efficacement lors de ces situations d'urgence.

Un travail de recherche et développement pour sélectionner les meilleures molécules est réalisé pour chaque nouveau candidat-médicament. Ce travail ne peut pas être réalisé *in vitro* car il ne permet pas de prédire le potentiel thérapeutique des molécules compte-tenu de la complexité des mécanismes impliqués dans le processus de coagulation. Il est donc indispensable d'utiliser un modèle animal proche de l'homme qui reproduit les différents aspects physiologiques d'un patient traité par un anticoagulant pour évaluer l'efficacité de nouveaux candidats-médicaments avant de conduire d'autres projets non cliniques (études de pharmacologie de sécurité, études toxicologiques) et/ou des études cliniques. Les autorités réglementaires peuvent exiger ces études d'efficacité pour mettre en évidence les propriétés pharmacologiques d'un candidat-médicament.

Ce projet consiste ainsi à évaluer l'efficacité de nouveaux candidats-médicaments pouvant restaurer l'hémostase chez des singes préalablement traités avec un médicament anticoagulant pendant un ou plusieurs jours.

Les candidats-médicaments seront administrés par la voie ciblée chez l'homme ou toute autre voie mimant la voie thérapeutique ciblée. La fréquence et la durée d'administration seront variables selon les candidats-médicaments.

Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit ; ce nombre correspondra au nombre minimum pour permettre une analyse fiable des données principalement par l'évaluation de différents paramètres de coagulation. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet de 3 ans n'excèdera pas 80 macaques.

Tous les traitements et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures validées éthiquement ; si requis, les administrations seront réalisées sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intraveineuse par exemple)

Depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et évalués par rapport à des points limites définis pour éviter tout inconfort prolongé ; si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

Conformément à la Directive 2010/63/EU, l'hébergement en petit groupe de deux ou trois sera privilégié pour éviter les blessures et saignements. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement (renforcement positif, choix des types de jouets, perchoirs, musique)

Les animaux seront manipulés par le personnel expérimenté et spécialement formé à la contention douce et atraumatique des singes pour éviter tout traumatisme à l'animal ; compte tenu du risque d'hémorragie, un suivi vétérinaire poussé sera réalisé.

13556 Malgré les nombreux traitements proposés dans le traitement du cancer, il n'existe pas toujours une alternative lorsque la tumeur est résistante au traitement proposé en première intention. Cependant, un lien a été établi entre cette résistance et le profil moléculaire de la tumeur et plus précisément, une mutation spécifique a pu être identifiée dans la résistance au Cétuximab des cancers colorectaux.

Le développement de la recherche par modélisation informatique permet d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des molécules sous AMM. Le lien entre conformation spatiale et activité biologique permet d'orienter ces anciennes molécules vers un nouvel axe thérapeutique. La molécule que nous souhaitons évaluer est initialement un agent anti-infectieux qui agit sur un récepteur spécifique dont le rôle dans le développement des cellules cancéreuses a été préalablement démontré.

Des études préliminaires ont pu mettre en évidence que la molécule d'intérêt permettait d'augmenter l'efficacité du traitement au Cetuximab dans le cancer du poumon.

Comme dit précédemment, la mutation identifiée comme résistante au Cetuximab est fortement représentée dans les cancers colorectaux. Nous nous proposons donc d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la combinaison de notre molécule d'intérêt avec le Cetuximab dans différents modèles de tumeurs dérivés de patients atteints de cancers colorectaux selon leur profil mutationnel.

Ce projet nécessitera 275 souris. Actuellement il n'existe pas de modèles *in vitro* pertinents et permettant de traduire la réponse à cette combinaison telle qu'elle existe chez les patients. Pour limiter le nombre d'animaux employés, nous testerons l'efficacité sur un premier modèle dont la résistance au Cetuximab est la plus importante puis, si une efficacité est avérée, nous testerons les autres modèles dont la résistance a été établie afin de pouvoir généraliser notre conclusion. Tous les moyens seront mis en oeuvre pour améliorer le bien-être des animaux. Toutes les procédures seront réalisées avec les protocoles d'anesthésie et d'analgésie nécessaires, les animaux seront stabulés en groupe. Leur hébergement se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu adapté à l'espèce et un suivi quotidien. Tout signe de douleur ou de souffrance sera considéré et les mesures nécessaires seront prises : traitements analgésiques, enrichissement supplémentaire, alimentation enrichie voire euthanasie si aucune des actions précédentes n'a été efficace. Les points limites préalablement établis seront strictement appliqués.

13557 Les circuits neuronaux de la cataplexie chez la souris

Mots clés: sommeil, narcolepsie, vigilance, cataplexie.

Durée du projet: 5 ans. Type de projet : Recherche fondamentale.

Nombre d'animaux nécessaires : 95 souris.

Le projet contient trois procédures. Le degré de sévérité, estimé modéré, est de par la présence d'une intervention chirurgicale en début de chaque procédure. Toutes les étapes suivantes n'induiront aucune souffrance à l'animal. Néanmoins, un suivi du bien-être de l'animal sera réalisé quotidiennement sur toute la durée des procédures.

La narcolepsie est une maladie neurologique rare dont les principaux symptômes sont l'hyper-somnolence en journée, un mauvais sommeil de nuit et des cataplexies. La cataplexie est une perte de tonus musculaire pendant l'éveil, déclenchée par le rire ou la surprise, qui s'accompagne souvent de la chute de la personne. C'est une maladie handicapante ayant un fort impact négatif sur la qualité de vie des patients.

Aucune cure n'existe à ce jour et les traitements disponibles sont symptomatiques, basés sur l'utilisation de stimulants pour favoriser l'éveil et d'antidépresseurs pour réduire l'apparition des cataplexies. Ces traitements sont d'une efficacité modérée, peu spécifiques ou contraignants.

L'objectif de notre projet de recherche est de caractériser, par de multiples approches, la cataplexie afin de mieux comprendre sa neurobiologie et apporter les éléments scientifiques nécessaires au développement de traitements innovants. Pour cela, nous réaliserons l'enregistrement de multiples paramètres physiologiques pendant la cataplexie dont nous comparerons les caractéristiques à celles obtenues pour ces mêmes paramètres pendant l'éveil calme et les différents types de sommeil, dans deux modèles de souris narcoleptiques.

Chaque animal ne sera soumis qu'à une seule et unique procédure expérimentale avec mise à mort requise pour les analyses post-mortem sur le cerveau, éliminant toute possibilité de réutilisation.

Nous répondrons explicitement aux principes et exigences des 3R :

Remplacement: Nos travaux seront conduits chez la souris, un modèle reconnu de narcolepsie de type 1 exprimant l'hyper-somnolence diurne, la fragmentation du sommeil et les cataplexies. Les réseaux neuronaux responsables du sommeil et de l'éveil que nous ciblons sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme. Ils sont aujourd'hui bien identifiés.

Réduction: Le nombre d'animaux prévu est légitimé par l'organisation de l'étude autour de trois procédures expérimentales indépendantes. Il tient compte des erreurs et échecs aux différentes étapes des procédures appliquées aux animaux. Pour la durée complète du projet, il est prévu un total de 95 animaux, répartis en 5 lots expérimentaux. La taille respective des lots a été calculée de manière à ne pas compromettre les objectifs scientifiques et la significativité des données (petits échantillons).

Raffinement: Par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil qui constitue notre corps de métier au laboratoire requiert des animaux constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les cataplexies ne s'expriment que si les souris, comme les humains, sont dans des conditions de bien-être. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les procédures expérimentales sont d'ores et déjà maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnes compétentes, formées et suivies dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue à l'expérimentation animale.

13558 Bien que la production de viande bovine représente une réelle opportunité de maintien de l'activité dans nombre de régions défavorisées, la situation économique des éleveurs est très difficile. Pour maintenir des revenus décentés, les éleveurs de viande bovine ont augmenté la taille de leur troupeau grâce à une nette amélioration de la productivité du travail mais aussi avec une forte augmentation de l'utilisation de concentrés dans l'alimentation des vaches. Ce recours aux concentrés a pour justification la sécurisation de la productivité du troupeau en limitant les risques alimentaires liés à une production d'herbe variable en fonction des conditions climatiques. Or le prix des céréales et des protéines continuera de croître en conséquence de l'accroissement de la

consommation humaine et de la demande mondiale d'aliments pour animaux. Par conséquent, la stratégie actuelle des éleveurs de bovins allaitants n'est clairement pas durable. L'utilisation de concentrés dans la production de viande bovine doit se limiter à l'engraissement des bovins de boucherie avant l'abattage, tandis que les vaches allaitantes doivent maximiser l'exploitation des prairies par le pâturage et la conservation de fourrages grossiers. Pour assurer leur production, une utilisation efficiente de ces fourrages est primordiale.

Ce changement nécessaire dans les pratiques d'alimentation des troupeaux coïncide avec une modification de la production d'herbe suite aux changements climatiques: on s'attend à une plus grande variabilité entre années et saisons et à des disettes plus fréquentes dues aux stress hydriques estivaux. Dans ce nouvel environnement les vaches devront être capables de faire face à un environnement plus contraignant où les périodes de moindre pousse de l'herbe surviendront plus fréquemment, sans compromettre leur carrière productive. Une production de viande bovine durable requiert donc des vaches robustes capables de maintenir leur production tout au long de l'année sans faire appel à des compléments lors des périodes de disette.

Afin de mettre en évidence des différences de capacité adaptative à ces variations de niveau alimentaire, l'expérimentation vise tout d'abord à quantifier l'efficacité alimentaire de 205 femelles en les soumettant à un contrôle individuel des quantités de fourrages ingérées à deux périodes de leur vie, avant leur première mise à la reproduction et au stade adulte après trois lactations. L'expérimentation vise également à suivre les performances de ces vaches charolaises pendant 3 lactations en les soumettant à des challenges alimentaires, c'est à dire à des variations des apports avec une phase de restriction en période hivernale suivie d'une phase de récupération avec une alimentation abondante au pâturage. Ces variations de milieu sont maîtrisées en niveau et en durée.

Une extension du projet s'intéresse également à la composante digestive de l'efficacité alimentaires des animaux mesurés, via l'étude de la population des micro-organismes, ou microbiote, hébergés dans leur tractus digestif. Du fait de l'étroite relation symbiotique entre l'hôte et le microbiote ruminal, l'analyse des différences d'efficacité digestive entre animaux sera d'autant plus pertinente qu'elle intégrera les interactions entre l'hôte et l'écosystème microbien ruminal. L'objectif de cette extension est donc d'étudier l'implication des diverses populations de microorganismes du rumen dans les différences d'efficacité alimentaire et d'émission de méthane entérique de vaches adultes.

Le principe des 3R a été pris en compte dans la construction du projet :

- Remplacement : les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire, de culture d'organe ou dans une autre espèce.
- Réduction : les effectifs utilisés sont issus d'un compromis entre puissance du dispositif et nombre d'animaux disponibles.
- Raffinement : afin de minimiser la douleur, les prises de sang nécessaires au protocole seront réalisées au niveau de la queue des animaux, peu fréquentes, pour des volumes faibles et espacées d'au moins 24h.

Les conditions d'hébergement, d'alimentation, de prophylaxie et de traitement des animaux ne sont pas modifiées par la mise en œuvre du projet et restent conformes aux conditions classiques d'élevage.

13559 Introduction : L'arrêt cardio-respiratoire (ACR) est une pathologie fréquente et grave. La prise en charge suit des recommandations internationales qui sont réactualisées tous les 5 ans. Actuellement, les équipes de secours alternent 30 compressions et 2 insufflations jusqu'à ce que les voies aériennes soient protégées. Dès qu'une voie d'abord est disponible, 1 mg d'adrénaline est administré toutes les 3 à 5 minutes ainsi que 300mg de cordarone lorsque le rythme est choquable. L'efficacité de l'adrénaline dans la prise en charge d'un ACR n'a jamais été clairement démontré. La littérature décrit une probable augmentation du taux de reprise d'activité cardiaque spontanée (RACS) en pré- hospitalier sans nette amélioration de la survie à la sortie de l'hôpital ou du pronostic neurologique. De plus, les effets cumulatifs des bolus d'adrénaline peuvent être délétères et la dose de 1mg n'a jamais montré sa supériorité par rapport à des doses plus faibles.

But de l'étude : comparer l'effet hémodynamique de différents dosage d'adrénaline ou de noradrénaline lors d'un arrêt cardiaque réfractaire induit par stimulation électrique sur un modèle porcin.

Objectif principal : Déterminer la dose minimale d'adrénaline permettant d'obtenir la meilleure pression perfusion coronarienne

Modèle et monitoring : Nous utiliserons 23 cochons Landrace de 60kg, sédatisés et sous analgésie contrôlée. Après intubation et mis sous ventilation assistée, un cathéter artériel sera installé en fémoral et une voie veineuse centrale en jugulaire droite.

Dans un premier temps, réalisation de courbes doses-réponses en évaluant la réponse hémodynamique de 3 cochons sédatisés à différentes doses de noradrénaline. Déroulement de l'expérimentation : 30 minutes de repos après mise en place du monitoring, induction d'une fibrillation ventriculaire par la sonde d'entraînement introduite par la fémorale, huit minutes d'arrêt puis démarrage du massage cardiaque externe par l'appareillage Lucas 2.

Quatre groupes de 5 cochons seront randomisés avec injection toutes les 5 minutes de : - Groupe 1 : 1mg d'adrénaline lors de chaque bolus

- Groupe 2 : 0,5mg d'adrénaline lors de chaque bolus

- Groupe 3 : 0,25mg d'adrénaline lors de chaque bolus

- Groupe 4 : administration de noradrénaline, doses à définir en fonction des résultats sur les 3 premiers cochons test

Monitoring : avant l'induction de la fibrillation ventriculaire, puis enregistrement en continu des paramètres continus incluant les paramètres hémodynamiques et respiratoires.

Durée de l'expérimentation : 30 minutes

Ce projet utilisera 23 cochons permettant ainsi de faire une étude statistiquement exploitable.

Remplacement: il n'existe pas de modèle alternatif à l'expérimentation animale.

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique chez l'humain. Ce modèle est maîtrisé par notre équipe et déjà en place dans notre structure ce qui nous permet de réduire le nombre d'animaux (réduction). Raffinement : Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) assurent le bien-être de l'animal durant toute la phase expérimentale.

13560 La chlordécone est un insecticide qui a été utilisé dans les bananeraies des Antilles françaises, il est interdit depuis plus de 20 ans mais est encore présent dans les sols. Cette molécule est un polluant organique persistant qui peut être transféré dans la chaîne alimentaire. La question qui se pose est celle du maintien de l'élevage dans les zones contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier des carcasses de ruminants dont les teneurs en polluants dépassaient les LMR les rendant impropres à la consommation.

La chlordécone est connue pour être métabolisée en chlordécol chez certaines espèces. Une étude récente (2018) a mis en évidence la présence de ce métabolite chez le porc. L'apparition de métabolites de la molécule mère et leur excrétion constituent des voies d'élimination de la chlordécone. Comprendre les mécanismes d'élimination du chlordécol permet de mieux comprendre le devenir de la chlordécone chez le porc et de compléter les données sériques et fécales de toxicocinétique de la chlordécone existantes chez le porc. 4 porcs mâles castrés en croissance seront utilisés pour l'étude envisagée. Ainsi, du chlordécol sera administré par voie intraveineuse via un cathéter jugulaire. Des prélèvements de sang et de fèces seront ensuite

effectués dans les 3 jours suivant l'injection sur la seconde jugulaire cathétérisée. Une mise à mort réglementaire sera effectuée sur les 4 porcs à 72h afin de permettre des prélèvements de bile et de contenus digestifs.

Remplacement : pour obtenir ces informations, aucun remplacement n'est envisageable pour ce type d'étude. Les données collectées serviront à la construction d'un modèle compartimental de transfert de la chlordécone à l'échelle de l'animal et permettront de calculer finement les sorties de chlordécone de l'animal.

Réduction : Le nombre d'animaux sera limité au maximum pour des raisons d'éthique. Un nombre de répétitions de 4 apparaît cependant nécessaire et suffisant pour s'assurer de la puissance statistique nécessaire (sur la base de l'expérience antérieure de l'équipe de recherche en terme d'écart-type résiduels prévisibles pour les porcs et la sensibilité analytique du dosage de la chlordécone et de son métabolite).

Raffinement : Les animaux seront placés en logement collectif conformément à la réglementation, sauf à partir de la mise en place des cathéters jugulaires pour éviter les risques d'arrachement de cathéters soit sur une période de dix jours. Cependant afin d'assurer un maximum de bien-être aux animaux, les contacts visuel, auditif et olfactif seront préservés. Des éléments d'enrichissement du milieu seront ajoutés dans les boxes.

Points limites : Compte-tenu des interventions envisagées une surveillance régulière sera nécessaire. Lors de celles-ci, des comportements d'inconfort (prostration, refus de nourriture, vocalisation) seront relevés. Par ailleurs, une évaluation de la douleur sera réalisée quotidiennement sur le comportement de l'animal. On considèrera que toute chute de poids de plus de 10% entre deux pesées (une pesée ayant lieu une à deux fois par semaine) impliquera un protocole de soin ou une mise à mort en cas d'abattement profond.

13561 De nos jours, les arythmies cardiaques sont une cause importante de morbidité et de mortalité dans les pays développés et constituent un problème de santé publique important. Les médicaments anti-arythmiques sont pour la plupart inefficaces voire dangereux, car ils peuvent entraîner eux-mêmes des arythmies. Seuls les bêta-bloquants et les défibrillateurs implantables semblent capables de prévenir le décès des patients. Les bêta-bloquants agissent en empêchant la fixation de l'adrénaline sur les récepteurs bêta-adrénergiques du cœur. Lorsqu'ils sont activés par l'adrénaline, ces récepteurs augmentent le rythme et la force de contraction mais aussi les arythmies cardiaques en augmentant l'activité d'une protéine particulière, la protéine kinase A. Il existe deux types de protéine kinase A dans le cœur, mais leur rôle respectif n'est pas bien connu. Dans ce projet, nous souhaitons comprendre le rôle de la PKA de type I dans le rythme cardiaque dans le but de développer de nouvelles thérapies contre certaines formes d'arythmies.

Pour cela nous avons créé une lignée de souris dans laquelle il est possible d'activer la PKA de type I de manière spécifique et permanente dans la structure cardiaque contrôlant le rythme. Ce projet consiste à caractériser le phénotype cardiaque de cette lignée de souris par échocardiographie et par électrocardiogramme en Holter (ECG). Les sessions d'imagerie réalisées sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur, ni angoisse chez les animaux.

Ce projet dans son ensemble a pour but d'investiguer un potentiel rôle de cette protéine dans la physiopathologie moléculaire des arythmies lors d'insuffisance cardiaque et permettre ainsi de développer une nouvelle thérapie contre cette maladie. Les modèles animaux ne peuvent être remplacés par un modèle *in vitro* ne présentant pas l'environnement cellulaire complexe et adéquate, ni sur des lignées de cellules cardiaques adultes, ces cellules ne conservant pas un phénotype stable et ne survivant pas au-delà de 48h de mise en culture primaire.

Néanmoins, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés, en se limitant à 48 pour concilier à la fois la limite statistique raisonnable d'une étude scientifique et la règle des 3R. Les procédures utilisées se font dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux, tout en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques.

13562 Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de décès dans le monde. Elles ont été responsables d'environ 17,7 millions de décès en 2016 (Organisation Mondiale de la Santé), représentant 30% des décès toutes causes confondues et pourraient atteindre 23,3 millions en 2030 selon les prévisions. Les MCV représentent donc un problème de santé publique majeur et, par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans leur physiopathologie est requise afin d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques et de développer de nouveaux moyens diagnostiques et pronostiques.

Dans ce contexte, l'athérosclérose est indéniablement la pathologie principale, responsable de la grande majorité des décès. Cette maladie inflammatoire, chronique, progressive et multifacettes affecte les vaisseaux sanguins de gros et moyen calibre. Elle est caractérisée par des dépôts de graisse au niveau de la paroi des vaisseaux formant la « plaque d'athérome ». Dans les phases les plus compliquées, des dépôts de calcium s'ajoutent à ces plaques entraînant la formation de régions vasculaires dites « calcifiées ». Ces dernières, responsables d'une rigidité élevée du vaisseau, induisent une augmentation de la pression artérielle. L'étape ultime de cette pathologie est la rupture de la plaque conduisant à l'obstruction du vaisseau, à l'origine notamment de crise cardiaque et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC). La recherche de nouvelles cibles médicamenteuses devient donc un besoin urgent. Dans ce cadre, il a été observé que certains peptides (fragments de protéines), issus de la dégradation de l'élastine (protéine responsable de l'élasticité du vaisseau sanguin) de la paroi vasculaire, participaient au développement de la maladie mais aucune donnée précise n'existe encore à ce jour concernant leur rôle dans l'évolution des plaques d'athérome et la rigidité vasculaire. De plus, on peut également retrouver des peptides d'élastine carbamylés du fait de la réaction de carbamylation souvent retrouvée chez ces patients. La réaction de carbamylation est une modification des protéines consistant en la fixation de molécules de cyanate sur ces protéines, modifiant leur structure et leur fonction.

Ainsi, ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées pour être davantage sensibles à la formation de plaques d'athéromes et comprendra un régime alimentaire riche en graisses afin d'induire chez l'animal le développement de l'athérosclérose.

Une première tâche sera consacrée à l'étude du rôle de ces peptides, préalablement carbamylés ou non avec du cyanate, sur l'apparition et le développement des plaques d'athérome et de la rigidité vasculaire. Pour cela, les souris génétiquement modifiées recevront des injections hebdomadaires des différents types de peptides étudiés pendant une durée de 6 semaines associés au régime riche en graisses.

La seconde tâche se focalisera sur différentes approches thérapeutiques pour contrer l'effet de ces peptides produits, dans ce cas, par l'organisme même des souris génétiquement modifiées, autrement dit de façon endogène. Il a en effet été montré que le régime alimentaire riche en graisse précité administré pendant une période de 12 semaines induisait la génération des peptides étudiés de façon endogène. L'ajout de cyanate dans l'eau de boisson en parallèle du régime permet quant à lui de favoriser la réaction de carbamylation et d'ainsi obtenir des peptides d'élastine carbamylés endogènes.

Durant chaque procédure, l'évolution de la pathologie sera évaluée grâce à des techniques d'imagerie non invasives permettant un suivi sans douleur pour l'animal et dont le stress sera limité par une anesthésie générale.

Une attention toute particulière sera portée au bien-être des animaux par l'application stricte de la règle des 3R :

- Raffiner :
 - Observation quotidienne des animaux afin de garantir leur bien-être et détecter d'éventuels signes de douleur ou de stress
 - Utilisation d'anesthésiques, d'analgésiques et d'antalgiques pour prévenir et/ou traiter toute douleur éventuelle
 - Fixation de points limites observés tout au long du projet afin d'éviter toute souffrance non soulagée par les soins apportés (auquel cas l'animal sera mis à mort)

- Conditions d'hébergement limitant le stress (enrichissement du milieu de vie, respect de leur vie en groupe, surveillance quotidienne)

- Utilisation d'outils d'imagerie non invasifs

• Réduire :

Par souci de reproductibilité et afin de s'affranchir d'une variable biologique supplémentaire et limiter l'hétérogénéité, uniquement des souris mâles seront considérées.

Ce projet nécessitera sur toute sa durée (5 ans), un nombre maximal de 77 souris réparties en 11 groupes/conditions :

- 1ère tâche : 7 souris x 3 conditions soit 21 souris

- 2e tâche : 7 souris x 8 conditions (2 sans traitements et 6 avec traitements) soit 56 souris

Ce nombre a été calculé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en permettant une interprétation fiable des résultats basée sur des analyses statistiques adaptées.

• Remplacer :

Une étude *in vitro* seule ne peut suffire pour représenter les mécanismes physiologiques d'un organisme entier et les approches informatiques ne permettent pas à ce jour de mimer la fonction d'un organisme et sa réaction face aux traitements. Ainsi, nous n'avons pas d'autres choix que d'utiliser le modèle animal pour apporter la preuve de concept de l'efficacité diagnostic et/ou thérapeutique de notre étude.

13563 La cryptosporidiose est connue comme responsable de diarrhées néonatales, seule ou en associations avec d'autres maladies, principalement chez les jeunes ruminants. En effets, les jeunes ruminants sont très sensibles à l'infection cryptosporidienne dès la naissance. La cryptosporidiose se traduit par des diarrhées responsables d'une déshydratation plus ou moins importante. Les animaux excrètent de très grandes quantités d'oocystes directement infectieux et très résistants dans le milieu extérieur, ce qui explique l'aspect très contagieux de la maladie. De plus, la cryptosporidiose pourrait être compliquée par l'association d'autres entéropathogènes (surinfections assez fréquentes par *E. coli*, *Salmonella*, *Rotavirus*, *Coronavirus*, et *Coccidia*). La morbidité et la mortalité peuvent être très élevées, même en l'absence de surinfections.

Désormais, la cryptosporidiose est considérée comme une zoonose émergente posant un réel problème de santé publique, avec des conséquences économiques et zootechniques non négligeables. Plusieurs molécules ont été testées, mais aucune ne permet de contrôler totalement la maladie. Ainsi, l'absence de traitements pleinement efficaces pour lutter contre cette maladie chez l'Homme et les animaux, couplée à l'absence de vaccins préventifs, a incité la communauté scientifique à poursuivre la recherche contre ce parasite. Puisqu'il s'agit d'une zoonose, trouver une thérapeutique « anti-cryptosporidienne » pleinement efficace pour les animaux est devenu une des préoccupations majeures dans la lutte contre cette maladie, et pourrait limiter, non seulement la transmission de ce parasite aux humains, mais aussi les pertes économiques dans les élevages de ruminants domestiques.

Ce travail s'insère dans une perspective de santé humaine et vétérinaire. Il a pour objectif principal la mise en évidence de l'intérêt d'une stratégie innovante de prévention de la cryptosporidiose chez le veau. Dans une étude antérieure, des résultats très encourageants ont été relevés chez le chevreau, la distribution de levure probiotique ayant réduit de manière significative l'excrétion d'oocystes. Aussi, il convient à ce jour de confirmer la fonctionnalité de cette levure probiotique chez le veau d'élevage laitier.

Pour ce faire 9 veaux recevront la levure probiotique dès l'introduction dans le dispositif expérimental avant d'être infectés par *Cryptosporidium parvum*, ils seront comparés à 9 veaux non traités et inoculés. L'introduction de veaux naissant ne permet pas de contrôler leur statut sanitaire à priori. D'expérience il est possible que quelques veaux présentent des signes cliniques indépendants de l'infection *C. parvum*. Ces animaux devront être exclus de l'étude et remplacés. De ce fait, nous prévoyons 6 animaux supplémentaires qui ne seront inclus dans le projet que si nécessaire. Ce projet concerne donc un nombre total maximal de 24 animaux.

La règle des 3 R sera strictement respectée.

Remplacement : le projet vise à étudier des levures probiotiques ayant un effet positif sur la structure intestinale et donc indirectement sur l'infection parasitaire. Il n'est donc pas envisageable de réaliser ces tests *in vitro*.

Réduction : le design expérimental a été établi pour réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans le protocole et obtenir des résultats exploitables

Raffinement : Les veaux seront hébergés en conditions contrôlées A2 du fait du caractère zoonotique de l'agent pathogène étudié. Afin d'enrichir l'environnement des veaux, des brosses seront mises à leur disposition et la salle est aménagée pour permettre un contact visuel entre les animaux.

13564 L'hémophilie est une maladie hémorragique causant des saignements anormalement longs et fréquents dus à une mauvaise coagulation du sang. A ce jour de nombreux traitements sont disponibles, mais la prise en charge thérapeutique de cette maladie reste insatisfaisante si l'on considère la qualité de vie des patients. Tous les traitements disponibles présentent des limites d'utilisation dont une demi-vie courte, le risque d'induction de réponse immunitaire, ou la voie d'administration invasive par injection.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes orientés vers la recherche de composés chimiques qui présentent des propriétés procoagulantes capables de corriger le défaut de coagulation et qui puissent être administrable par voie orale. Cette stratégie représenterait un véritable bénéfice pour la qualité de vie des patients hémophiles mais aussi un réel bénéfice d'un point de vue économique, puisque les coûts de développement et de production d'une molécule chimique seraient beaucoup plus faibles que ceux des biomolécules actuellement disponibles.

Nous avons identifié dix molécules chimiques qui présentent des propriétés procoagulantes *in vitro* et donc qui sont susceptibles de corriger le défaut de coagulation dans le plasma de patients hémophiles. A présent que nous avons identifié *in vitro* les effets procoagulants de ces dix molécules issues de la synthèse chimique, une étude chez l'animal est nécessaire dans un modèle de souris hémophile afin d'évaluer si ces molécules conservent leur potentiel procoagulant. En effet, l'arrêt du saignement lors d'une coupure du vaisseau fait intervenir des composantes cellulaires et moléculaires dont les interactions, très complexes, ne peuvent pas être reproduites à l'heure actuelle *in vitro* du fait de leur complexité et de la multitude de partenaires.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs, les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. L'ensemble des expériences seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Par ailleurs, pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaire pour chaque procédure pour avoir une réponse statistiquement analysable. Ainsi le nombre total de souris prévu est de 176.

13565 La combinaison de microbulles de gaz avec les ultrasons fournit des alternatives sans précédent pour la délivrance intracérébrale de médicaments pour le traitement de maladies neurodégénératives. L'oscillation des microbulles sous l'effet des ultrasons à proximité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), augmente transitoirement sa perméabilité et permet ainsi la pénétration des médicaments dans le cerveau. L'efficacité de cette méthode à délivrer des médicaments dépend fortement du type de microbulles utilisé (nature du gaz et des constituants de la microbulle). A ce jour, aucune étude comparant l'efficacité de différents types de microbulles à perméabiliser réversiblement la BHE par sonoporation n'a été réalisée. Dans ce contexte, nous évaluerons l'efficacité de 5 types de microbulles à ouvrir la BHE. Les objectifs sont: (1) d'affiner les paramètres acoustiques et la dose de microbulles permettant l'ouverture réversible de la BHE, qui sera objectivée par injection intraveineuse (iv) d'un colorant, le Bleu d'Evans ; (2) de mesurer l'efficacité de l'ouverture de la BHE par une analyse histologique des tissus cérébraux et par une

analyse biochimique du sang et du liquide céphalo-rachidien (LCR). La prise en compte de la règle des 3R se décline par: REMPLACEMENT - Dans une première approche expérimentale, nous avons démontré l'efficacité in-vitro de 5 microbulles à perméabiliser efficacement des cellules endothéliales et cérébrales. Dans la continuité de ce projet, nous souhaitons aujourd'hui étudier l'efficacité de ces 5 types de microbulles à ouvrir la BHE chez le rat mâle. Par conséquent, à ce stade du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico. REDUCTION - Sur la base de nos études antérieures, notre étude nécessite 315 rats. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 15 rats. Nous réaliserons une étude statistique pour déterminer si l'ouverture de la BHE induit une accumulation du Bleu d'Evans et une variation des marqueurs biochimiques du sang et du LCR. RAFFINEMENT - Les rats seront hébergés par groupe de 4 en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux seront observés deux fois par jour. Les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux seront manipulés sur un tapis chauffant avec une restriction minimum de l'isolement social. Les animaux seront placés sous surveillance à leur réveil.

13566 La dépendance à la nicotine demeure un problème majeur de santé publique dans le monde entier, et les traitements pour les fumeurs qui veulent arrêter de fumer ne restent que marginalement efficaces. L'usage de la nicotine peut entraîner une dépendance par le biais de processus complexes qui sont régulés à la fois par ses effets récompensants et par ses effets aversifs. En fait, les humains comme les animaux de laboratoire régulent leur consommation de nicotine lorsqu'ils s'auto-administrent de la nicotine, en jouant sur cette balance renforcement/aversion. L'effet primaire de la nicotine sur le système nerveux central est d'activer les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR), modifiant ainsi l'activité électrique des neurones. Il existe de nombreux types de nAChRs neuronaux, qui ont des propriétés biophysiques et des distributions tissulaires variées. Identifier et comprendre le rôle spécifique de certains types de nAChR et de certaines voies neuronales dans la transmission des effets récompensants et aversifs de la nicotine est crucial à la compréhension des mécanismes de la dépendance au tabac et au développement de nouvelles thérapies.

Le but de ce projet est 1) d'identifier les voies neuronales et les récepteurs nicotiques impliqués dans la régulation de la consommation de nicotine (renforcement et aversion) ; 2) de caractériser les modifications moléculaires et cellulaires de ces voies suite à une exposition aiguë ou chronique à la nicotine et 3) de manipuler en ligne la consommation de nicotine à l'aide d'outils optogénétiques, chémo-génétiques ou optopharmacologiques.

Pour cela nous utiliserons des souris C57B/6 de type sauvage (WT) et des souris délétées pour certaines sous-unités des nAChRs (b2^{-/-} et b4^{-/-}). Nous utiliserons également des lignées GAD67-Cre (ou Amygo1-Cre) et DAT-Cre afin de restreindre l'expression des transgènes aux neurones GABAergiques ou dopaminergiques des différentes voies neuronales de l'addiction, respectivement. Enfin, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées et développées par le laboratoire (LinAChR b2 et b4) permettant de contrôler les nAChR de la souris avec la lumière. Nous nous focaliserons principalement sur deux voies neuronales : la voie méso-cortico-limbique qui est impliquée dans le renforcement et la voie habénulo-interpédonculaire qui semble impliquée dans les phénomènes d'aversion. Pour l'ensemble des conditions, nous estimons que nous utiliserons 950 animaux pour ce projet qui s'étend sur 5 ans. Le choix des animaux se justifie par la présence d'un circuit de l'addiction (notamment un réseau dopaminergique et cholinergique) très similaire à celui de l'Homme, ce qui n'est pas le cas chez les invertébrés, les poissons ou les oiseaux. Enfin, la génétique de la souris offre des outils de modulation du réseau neuronal, ce qui est difficilement accessible chez d'autres animaux. De manière à restreindre le nombre d'animaux, les analyses et études statistiques seront effectuées quotidiennement, permettant de ne pas utiliser inutilement des animaux. Les animaux sont stabulés dans les conditions préconisées dans l'annexe A de la convention européenne sur l'hébergement des animaux de laboratoire (STE 123). Tous les actes chirurgicaux sont effectués sous anesthésie générale, et des antalgiques sont utilisés en pré- et post-opératoire, afin de minimiser la douleur chez l'animal. Dès la phase post opératoire, jusqu'à

la fin des expériences, chaque animal est examiné quotidiennement. L'ensemble de ces propositions vise donc à respecter le principe des 3Rs.

13567 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation, et ont l'obligation de les classer (réglementations REACH concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques, et CLP relative à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances chimiques et des mélanges). Si des essais expérimentaux s'avèrent nécessaires pour caractériser les dangers, les tests à utiliser s'appuient sur les lignes directrices (LD) de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE).

Cette demande porte sur la réalisation d'études de toxicité subaiguë (28 jours) de substances chimiques susceptibles d'être inhalées suivant la LD de l'OCDE n°412 adoptée le 25 juin 2018. L'objectif de ces études est de déterminer les effets de substances chimiques sur les fonctions pulmonaires en particulier, et sur l'organisme de manière générale. Les résultats obtenus doivent également contribuer à déterminer des valeurs toxicologiques de référence pour les substances testées.

Le projet est envisagé sur une durée de 5 ans avec une prévision d'une étude par an, soit un maximum de 5 études. En considérant le schéma expérimental le plus complet, un maximum de 210 animaux (125 mâles et 85 femelles) sera utilisé par étude, soit 1050 rats adultes (625 mâles et 425 femelles) pour 5 ans.

Ce projet comprend 2 procédures expérimentales.

La procédure 1 correspond à la réalisation d'études préliminaires de détermination des concentrations. Elle consiste en une exposition par inhalation, 6h/jour, 5 jours/semaine, durant 5 à 14 jours (durée à définir selon la nature de la substance testée et les objectifs de l'étude), de rats mâles et femelles, à 3 niveaux de concentration de la substance à tester et un témoin négatif. Des groupes satellites pourront être étudiés pour évaluer la réversibilité des effets. Dans cette procédure, un maximum de 84 animaux (42 mâles et 42 femelles) sera utilisé par étude, soit 420 animaux (210 mâles et 210 femelles) pour 5 ans. En considérant le schéma expérimental le plus complet pour cette procédure, par étude, 40 animaux seront utilisés pour constituer les groupes principaux (5 animaux/sexe/concentration testée), si nécessaire, 40 animaux pour l'étude des groupes satellites (5 animaux/sexe/concentration testée), et 4 animaux surnuméraires (2 animaux/sexe).

La procédure 2 correspond à la réalisation des études principales. Elle consiste en une exposition par inhalation, 6h/jour, 5 jours/semaine, durant 28 jours (4 semaines), à 3 niveaux de concentration de la substance testée et un témoin négatif. Dans cette procédure, un maximum de 126 animaux (83 mâles et 43 femelles) sera utilisé par étude, soit 630 animaux (415 mâles et 215 femelles) pour 5 ans. En considérant le schéma expérimental le plus complet pour cette procédure, par étude, 40 animaux seront utilisés pour l'étude des groupes principaux (5 animaux/sexe/concentration testée), si nécessaire, 80 animaux pour l'étude des groupes satellites (5 animaux/modalité testée), et 6 animaux surnuméraires (3 animaux/sexe).

Le mode d'exposition, en chambre d'exposition « corps entier » ou « nez-seul », sera défini selon la nature de la substance à tester.

Les animaux seront quotidiennement observés au plan clinique tout au long de l'étude. Ils seront pesés et leur consommation alimentaire et hydrique relevées une fois par semaine. Des analyses de pathologie clinique seront réalisées à partir de prélèvements de sang effectués en cours d'étude et post-mortem. Des examens ophtalmologiques seront également effectués.

Après mise à mort, un examen macroscopique, ainsi que des analyses sur des organes et des échantillons prélevés seront réalisés.

Le tatouage des animaux à l'oreille pour l'identification et les prélèvements de sang effectués à la veine jugulaire seront pratiqués sous anesthésie par inhalation d'isoflurane.

En cours d'étude, un animal présentant une pathologie pouvant être soulagée pourra recevoir un traitement médicamenteux (application de vétérédine en cas de lésion, injection(s) intramusculaire(s) de buprénorphine en cas de douleur).

Les animaux qui seront euthanasiés en fin d'étude et ceux qui auront atteint un point limite nécessitant la mise à mort en cours d'étude recevront une injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital.

Concernant la réduction, le nombre d'animaux qui sera utilisé suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°412.

Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être. Ils seront hébergés par sexe et par concentration à plusieurs par cage pour leur socialisation. Un fond sonore sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif. En cas d'exposition par voie oro-nasale, des tubes seront disposés dans les cages d'hébergement pour permettre aux animaux de se cacher, et se familiariser avec le dispositif d'exposition. Préalablement à l'exposition, tous les animaux seront habitués à la contention imposée par le placement dans les tubes en y étant stabulés au moins 30 min par jour, plusieurs jours consécutifs. Les tubes seront tapissés de matériaux absorbants pour assurer le confort des animaux. Après chaque phase d'habitué, de la nourriture sera déposée dans leurs cages d'hébergement en guise de récompense.

Pour ce qui est du remplacement, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives à l'expérimentation animale qui permettent de répondre au questionnement concernant la toxicité subaiguë de l'exposition à des substances par inhalation. Le recours aux études *in vivo* est donc indispensable. Concernant le choix des animaux, le projet suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°412, d'utilisation pour ces études du rat à l'âge jeune adulte et de souches communément utilisées en laboratoire.

13568 Une perturbation des mécanismes contrôlant la formation des réseaux de neurones dans le cortex cérébral pendant le développement embryonnaire est une cause de maladies neuropsychiatriques telles que les troubles de l'autisme, l'épilepsie, certains retards mentaux ou encore déficits cognitifs (ex : la mémoire). De récentes études ont révélé qu'un certain nombre de mutations sont impliquées dans le développement de ce type de pathologies.

Le présent projet s'inscrit dans le cadre de l'étude d'un gène (gène 1) qui joue un rôle essentiel dans le développement des terminaisons des cellules nerveuses (les axones) dans le système nerveux central. Par ailleurs, des mutations dans ce gène et associées à la pathologie autistique perturbent le développement cérébral et le comportement de la souris, avec notamment des altérations de la mémoire sociale et des altérations cognitives (défauts de mémoire spatiale à long terme).

Ce projet a deux objectifs. Le premier se concentre spécifiquement sur un autre gène (gène 2) qui a des fonctions similaires au gène 1 dans les neurones et pour lequel des travaux de recherche précédents ont démontré qu'ils sont nécessaires pour la croissance axonale. L'objectif sera de déterminer si la mutation du gène 2 entraîne les mêmes altérations comportementales que les mutations du gène 1. Pour le second objectif, un traitement à base d'un dérivé d'un acide aminé favoriserait le métabolisme des acides gras, permettant ainsi de rétablir un développement axonal normal *in vitro* malgré la mutation du gène 1. Dans ce sens, il serait intéressant de tester l'effet d'une supplémentation de ce dérivé sur les fonctions corticales des animaux mutés pour le gène 1. A noter que chez l'homme, des traitements par voie orale à base de ce dérivé sont utilisés chez le nouveau-né dans des cas de maladies métaboliques.

Ce projet, constitué d'une procédure unique, sera réalisé sur deux lignées de souris (soit 280 animaux) portant une mutation inactivant soit le gène 1, soit le gène 2. Le but de cette procédure est de soumettre les animaux à une série de tests de comportement s'intéressant à la fois aux

déficits cognitifs (apprentissage/mémoire spatiale, et mémoire conditionnée) ; ainsi qu'à d'autres symptômes associés aux troubles du spectre autistique (troubles de la communication, mémoire sociale ou encore comportements répétitifs stéréotypés). Pour chacune de ces lignées, les perturbations du comportement détectées dans notre modèle seront utilisées comme un marqueur fonctionnel des circuits corticaux. Le présent projet permettra donc une meilleure connaissance des liens moléculaires entre l'activité métabolique et la formation des circuits neuronaux fonctionnels.

Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour valider le caractère pathologique de ces différentes mutations ; en effet les altérations des fonctions cérébrales comme la mémoire ou la sociabilité ne peuvent pas être testées grâce à des approches *in vitro*. Une attention particulière sera accordée à la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires aux approches comportementales tout en s'assurant de la reproductibilité des résultats. Un délai minimal d'une semaine entre chaque série de tests sera mis en place afin de limiter tout stress éventuel des animaux. A noter que la supplémentation avec le dérivé d'acide aminé se fait par voie orale, dans l'eau de boisson, et que celui-ci a l'avantage d'être appétant pour les souris. Bien que la procédure soit non invasive, un suivi régulier des animaux sera réalisé et toute manipulation susceptible d'entraîner du stress sera réalisée par un expérimentateur formé aux techniques de contention et manipulation des animaux.

13569 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE), il est obligatoire de prouver l'efficacité de ces produits avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de tester intégralement l'efficacité des produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Par an, jusqu'à 612 animaux peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet.

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

baton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

13570 Le poisson-zèbre est devenu récemment un modèle d'étude important des relations hôte-pathogène. La transparence des animaux de cette espèce aux premiers stades de leur développement facilite la mise en œuvre des techniques d'imagerie *in vivo*. Des outils de manipulations de l'expression des gènes, de nombreux mutants, et la séquence complète du génome de cette espèce concourent aussi à son succès. De nombreux modèles de maladies humaines ont été développés chez le poisson-zèbre, non seulement chez la "larve" ou le jeune alevin, mais aussi aux stades plus tardifs ; le poisson-zèbre au stade adulte a été en particulier utilisé pour l'étude des relations entre les mycobactéries et leur hôte.

Il devient donc de plus en plus important d'approfondir notre connaissance du système immunitaire de cette espèce au stade larvaire comme au stade adulte. Il est également important de développer des modèles de vaccination chez le poisson zèbre.

Nos projets de recherche visent donc à :

- mieux comprendre les mécanismes de réponse spécifique du poisson zèbre contre différents pathogènes pour développer des modèles de maladies infectieuses humaines permettant de comprendre les mécanismes d'interaction entre le pathogène et son hôte. A terme, ces modèles permettront aussi de tester des substances actives pour combattre les pathogènes causant ces maladies infectieuses

- développer des vaccins efficaces contre des pathogènes chez le poisson zèbre. Ces modèles de vaccination constitueront des systèmes d'étude pertinents de l'immunité spécifique et de la mémoire immunitaire dans ces modèles.

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être réalisée dans des modèles *in vitro*, dans la mesure où les réponses aux vaccins assurant la protection se développent à l'échelle de l'organisme.

Des lignées cellulaires sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants (ie, substance visant à augmenter la réponse immunitaire induite par le vaccin), *in vitro* ; nous avons ainsi spécifiquement développé des lignées cellulaires issues de poisson-zèbre au laboratoire. Nous veillons ainsi à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible tout en maintenant des effectifs suffisants à l'obtention de résultats significatifs valorisables.

Nous effectuons les expériences dans un environnement adapté au poisson zèbre quel que soit le stade de développement considéré. Les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent pour limiter les possibilités de blessure et d'infection par les pathogènes environnementaux. Les poissons sont anesthésiés pour chaque intervention (vaccination et infection expérimentale par injection). Des points limites ont été définis pour le poisson-zèbre dans le contexte des infections expérimentales effectuées dans ce projet, permettant de sortir les animaux des protocoles dès que des signes d'altération de leur bien-être sont observés. Tous les prélèvements de tissus sont effectués post mortem.

Nous prévoyons d'utiliser au total 2080 poissons pour l'ensemble de ce projet ambitieux, correspondant essentiellement à des essais de protection après vaccination.

Les poissons sont d'abord vaccinés pour induire une réponse protectrice contre l'agent pathogène choisi. Dans un second temps, la protection assurée par cette réponse est testée par une infection expérimentale par ce pathogène. Les protections à court terme (2 mois après vaccination) et à long terme (6 mois après vaccination) seront testées.

13571 Objectif du projet : la neurodégénérescence avec perte progressive des structures et fonctions neuronales est le facteur causal clé de troubles neurologiques dévastateurs tels que la maladie d'Alzheimer (MA). Malgré les progrès significatifs de la recherche en neurobiologie, la prévalence de ces pathologies continue d'augmenter en raison du manque de traitements curatifs. La MA est un syndrome neurodégénératif associé à une perte progressive des fonctions cognitives. Elle est corrélée à des changements histologiques incluant des plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires et la mort neuronale. Les premières lésions apparaissent dans une zone du cerveau impliquée dans l'apprentissage et la mémoire, l'hippocampe. L'apprentissage et la mémoire reposent sur la plasticité des circuits de notre cerveau, c'est-à-dire la capacité des neurones à modifier de façon durable l'efficacité de leur transmission synaptique.

De plus, un nombre croissant de données épidémiologiques a démontré un lien entre le diabète de type 2 et la MA. Cette découverte a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche pour mieux appréhender la physiopathologie des maladies neurodégénératives et ouvrir de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce projet, nous proposons d'étudier dans des modèles de souris transgéniques de la MA et mutantes du diabète présentant des altérations de l'apprentissage et de la mémoire :

- les modifications des réseaux neuronaux liées au génotype par des enregistrements électrophysiologiques *in-vivo* (animal vigile ou anesthésié).

- l'efficacité / toxicité de composés en développement sur les modifications des réseaux neuronaux. Pour ces études, des enregistrements électrophysiologiques (animal vigile ou anesthésié) permettront d'étudier les modifications du réseau neuronal induites par administration unique ou répétée de composés en développement par voie entérale (orale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire).

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 6060 souris (60 souris seront dédiées aux actions de formation et de maintien de compétences).

Avantages : ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie *in vivo* (sur animal vigile ou anesthésié) permettra de mettre en évidence les modifications des réseaux neuronaux associés à des modèles de la MA et de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement sur les modifications du réseau neuronal liées à la MA. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones. Plusieurs paramètres électrophysiologiques peuvent être mesurés sur un même animal : l'activité neuronale, la plasticité synaptique et l'activité oscillatoire.

Dommmages escomptés : les modèles de souris que nous utiliserons présentent un phénotype dommageable. Leur bien-être sera attentivement suivi durant toute la durée du projet grâce à des fiches d'observation/points limites adaptées aux modèles. Des procédures de prise en charge adaptées seront mises en place. En cas d'administration de composés, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Pour les études sur l'animal vigile, suite au placement par chirurgie des électrodes, il se peut que les animaux présentent des signes de douleur malgré les précautions prises pendant la chirurgie (analgésiques, anesthésiques) et en post-opératoire (antibiotiques). Dans tous les cas, des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (remplacement) : l'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations seront réalisées chez la souris car il existe de nombreux modèles transgéniques associés à la MA, utilisés par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés ; ces rongeurs, de petite taille et d'élevage

facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (réduction et raffinement) :

-réduction : le nombre de rongeurs utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique, activité neuronale). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3. 1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : à leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (nids végétaux, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant la chirurgie, une période d'acclimatation des animaux d'au moins 5 jours sera respectée. Pendant la chirurgie, des mesures seront mises en place afin de réduire au maximum la douleur : anesthésiques et analgésiques, gel ophtalmique, maintien d'une température constante... Pour les études sur animal vigile après la chirurgie, les animaux seront isolés afin d'éviter tout dommage au niveau des implants ou l'apport de germes susceptibles de provoquer une infection. Les animaux recevront une antibiothérapie adaptée. Un suivi renforcé des animaux sera réalisé après la phase d'opération. Une période de récupération post-chirurgicale d'au moins 7 jours sera respectée. Dès réception des animaux, une observation journalière sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux (souffrance, angoisse...) et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

13572 Le développement de nouveaux traitements de type Host Directed Therapy (HDT) visant à manipuler directement le système immunitaire de l'hôte afin de lui permettre d'éliminer une tumeur ou une infection aigüe ou chronique est en plein essor. Ce type de traitement ne cible pas un pathogène ou un type de tumeurs en particulier mais un ou des mécanismes immunitaires, métaboliques, cellulaires de l'hôte qui peuvent être communs à différentes infections ou différentes tumeurs, qu'ils soient inhibiteurs ou activateurs de la réponse immune. Ces nouvelles thérapies comprennent entre autres le développement de protéines recombinantes (anticorps ou cytokines), de stimulateurs non spécifiques de l'immunité innée (par exemple de type agonistes de TLR), des petites molécules visant à interférer avec le métabolisme cellulaire par exemple.

Le laboratoire s'intéresse actuellement à ces nouvelles thérapies, notamment dans le cadre du sepsis dont l'origine peut être bactérienne, virale et/ou fongique et dans le but de rétablir la fonctionnalité du système immunitaire dans la phase d'immunosuppression post-sepsis telle qu'elle est décrite chez les patients. Le savoir-faire du laboratoire repose sur la vectorisation virale et le projet vise à démontrer l'intérêt de l'utilisation de vecteurs viraux comme carriers de molécules HDT. Pour ce faire, dans des études précliniques chez la souris, différents vecteurs viraux carriers de molécules HDT seront évalués et comparés à des molécules HDT basées sur des protéines recombinantes. Le but est de comparer la pharmacocinétique de ces molécules portées par des vecteurs viraux à celle des protéines recombinantes et d'évaluer leurs effets biologiques au niveau de l'organisme.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas complètement la complexité des mécanismes immunitaires chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer *in vivo* la pharmacocinétique des molécules d'intérêt et d'évaluer leur activité biologique notamment sur les cellules du système immunitaire à l'échelle d'un organisme complet.

A l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin pour ce type d'étude. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal.

Un suivi des animaux sera effectué quelques heures après toutes les injections et tout au long de la procédure afin de déceler d'éventuels symptômes de mal être. Un anesthésique local sera appliqué aux animaux avant tout prélèvements sanguins.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum et optimisé sans compromettre les objectifs de ce dernier. Certains groupes contrôles pourront voir leur nombre d'animaux diminuer en fonction des 1ers résultats obtenus.

Ce projet inclura un maximum de souris 522.

13573 De nos jours, les anticorps représentent une nouvelle classe de composés capables de moduler une grande variété de troubles ou de conditions physiopathologiques. Au laboratoire, nous nous intéressons plus particulièrement aux cibles modulant les comportements et la reproduction chez l'animal ou chez l'homme. Bien que des solutions existent pour maîtriser la reproduction, l'utilisation d'hormones stéroïdiennes ou d'analogues entraîne des risques pour la santé des patients et une accumulation dramatique dans l'environnement. Aucune solution n'existe actuellement pour les troubles des comportements. Nous développons donc des petits fragments d'anticorps, découverts chez les camélidés, qui ont des caractéristiques innovantes et uniques permettant potentiellement de contrôler la reproduction et les comportements. Nous avons identifié et validé *in vitro* des fragments d'anticorps modulant l'activité de cibles d'intérêt impliquées dans ces grandes fonctions physiologiques.

L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet de ces fragments d'anticorps sur le contrôle de la reproduction et des comportements *in vivo* et de les développer si nécessaire pour un usage chez l'animal. Bien que la maîtrise de la reproduction et des troubles du comportement ne soient pas dommageable pour la santé, ils affectent très sérieusement la qualité de vie au quotidien. Le modèle souris est le modèle animal de mammifère le plus adéquat pour mener à bien ces études *in vivo*, notamment du fait de sa taille réduite et parce que les mêmes cibles sont impliquées dans ces processus physiopathologiques chez les rongeurs et chez les espèces d'intérêt (homme, animaux d'élevage).

Ces expériences vont significativement contribuer à l'augmentation des connaissances scientifiques de ces cibles, mais également à la découverte et au développement de potentiels traitements innovants pour la reproduction et les comportements chez les animaux d'élevage et chez l'homme.

Le nombre total dans ces expériences sera d'un maximum de 3178 animaux (3160 souris et 18 rates). Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : tous les fragments d'anticorps ont été entièrement caractérisés et développés *in vitro*, mais il n'y a aucune méthode de remplacement à l'étude de la reproduction et les comportements.

Réduction : notre étude met en place des conditions à chaque étape du projet afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (jusqu'à plus d'un tiers du nombre total) et la durée d'expérimentation de chaque animal.

Raffinement : les animaux impliqués dans cette étude sont élevés dans les meilleures conditions d'élevage dans des cages en présence d'enrichissement. Les expériences sont menées dans les plus courts délais possibles afin de minimiser leur inconfort et leur stress et de les remettre dans leurs cages en présence de leurs congénères.

13574 Le cancer du pancréas représente un problème de santé publique en occupant le deuxième rang des cancers digestifs en France. Ce cancer est très souvent diagnostiqué à un stade avancé avec un nombre de cas en constante augmentation. Il devrait être la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe en 2030. Le traitement de ce cancer est adapté au patient (âge, antécédents médicaux, état de santé et profil de la tumeur). Potentiellement, la chirurgie est le seul traitement curatif de ce type de cancer, si celui-ci est diagnostiqué à un stade précoce. Sinon, la chimiothérapie avec ou sans la radiothérapie est recommandée. Nous avons montré, par des études sur des cellules en culture que les orexines, la molécule que nous étudions, produite normalement par le

cerveau chez l'Homme, provoque la mort cellulaire des cellules cancéreuses. De plus, dans les modèles précliniques chez la souris, un peptide a induit un fort effet antitumoral en provoquant la mort des cellules cancéreuses pancréatiques implantées.

Le développement de nouvelles molécules dans un but thérapeutique représente un défi majeur pour les prochaines décennies. Récemment, un anticorps humain, nommé C2, mimant les effets de ce peptide antitumoral a été produit. Il a été montré que cet anticorps était capable de provoquer la mort de cellules de cancer du pancréas en culture. Ceci est la première démonstration qu'un anticorps déclenchant la mort cellulaire pouvait représenter un candidat approprié envisager le traitement du cancer du pancréas.

Le but de notre projet sera de montrer que nos résultats sont transposables sur un modèle préclinique chez la souris présentant un système immunitaire affaibli. Notre modèle consiste à greffer des cellules cancéreuses de pancréas humain sous la peau des souris et de suivre au cours du temps la croissance des tumeurs sous-cutanées en fonction de différents traitements. Notre étude visera à 1) déterminer les effets antitumoraux de l'anticorps C2 par rapport aux traitements avec le peptide, 2) déterminer la dose optimale et le mode d'administration de l'anticorps C2 et 3) déterminer l'impact anti-tumoral du C2 sur une tumeur rendue résistante à la chimiothérapie.

Ce projet se déroulera sur une période de 3 ans dans des locaux agréés et nécessitera un nombre total de 120 animaux correspondant à 4 séries d'expériences de 30 animaux chacune visant à répondre aux 3 questions posées précédemment. La conformité avec les exigences de remplacement, réduction, et raffinement sera prise en compte : 1) remplacement : les connaissances issues de cette étude sur l'animal ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte tenu de la complexité physiologique de la tumeur comprenant plusieurs types cellulaires (tumoral, stromal et immunitaire) impossible à reproduire avec des lignées cellulaires, nous obligeant de travailler à l'échelle d'un organisme. Des études sur cellules en culture sont, par ailleurs, prévues pour étudier d'autres paramètres qui compléteront ce volet d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer ; 2) réduction : nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables (5 par sous-groupe) et 3) raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal (comme l'implantation en sous-cutané par injection des cellules tumorales) et l'utilisation d'antalgiques sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation (croissance tumorale). La procédure d'injection du peptide et/ou de l'anticorps C2 aux souris n'induit aucune souffrance manifeste des animaux et sera effectuée par injection en intrapéritonéal sur animal éveillé. Un suivi clinique et une surveillance des animaux (pesée, évaluation de l'état général, mesure des tumeurs sous-cutanées implantées) seront effectués 3 fois par semaine tout au long de la procédure qui durera au maximum 50 jours selon la vitesse de croissance des tumeurs. Nous avons prédéfini dans nos études antérieures les différents critères de points limites au-delà desquels l'expérience sera stoppée. Avant prélèvements des tumeurs à analyser les animaux seront euthanasiés. Au cours de la procédure, nous suivrons un groupe implanté avec les cellules tumorales qui constituera le groupe contrôle qui, développant des tumeurs mais non traitées, sera euthanasié également à la fin de l'expérience.

13575 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (MH) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

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

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes:

-La maladie d'Alzheimer: la surexpression de l'enzyme clé du métabolisme cérébrale du cholestérol à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles (amyloïde et tau) permet de restaurer les déficits mnésiques.

-La maladie de Huntington: La surexpression de cette même enzyme à l'aide d'un vecteur AAV permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

Le but final de l'étude est de compléter toutes les étapes précliniques, chez des souris modèles de la MH, avant de proposer cette approche thérapeutique chez les patients à un stade précoce de l'évolution de la MH. Cette approche sera utilisée pour comprendre si le ciblage des neurones qui jouent un rôle majeur dans la MH, pourrait avoir à la fois un effet bénéfique induit par 1) la surexpression de CYP46A1 et 2) à la fois par la diminution de la protéine responsable de la MH (à travers le blocage de l'expression de la huntingtine mutée (responsable pour MH) par des petites séquences d'acides nucléiques non codants, désignées miHTT) dans deux modèles murins de la MH.

Le présent projet a comme premier objectif de tester la surexpression combinée de l'AAV-CYP46A1/miHTT dans la MH. Le but est de 1) tester l'efficacité des AAV exprimant un gène témoin ou des gènes thérapeutiques (CYP46A1) /séquence miHTT (pour éteindre l'expression de la protéine huntingtine mutée) sous contrôle des promoteurs qui ciblent les neurones, dans différentes régions du cerveau des modèles murins pour la MH afin d'évaluer l'effet du traitement sur la 2) neuropathologie et sur les fonctions motrices. De plus, les niveaux de plusieurs biomarqueurs de la MH, présents au niveau du 3) sang et 4) liquide céphalo-rachidien seront analysés. A la fin de l'étude les souris seront 5) euthanasiées.

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

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

Réduction: Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (720) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter et les temps d'analyses.

13576 Ces travaux pratiques (TP) répondent au contenu du Programme Pédagogique National du DUT Génie Biologique et comprennent des enseignements pratiques en Physiologie et en Pharmacologie. Pour les étudiants qui souhaitent poursuivre dans des laboratoires de recherche et réaliser des procédures d'expérimentation animale, ces TP font partie intégrante d'une formation à l'expérimentation animale pour personnel réalisant des procédures expérimentales que nous mettons actuellement en place à l'IUT.

Les travaux pratiques réalisés par les étudiants visent à les familiariser avec les pratiques de l'expérimentation animale indispensables à leur formation de techniciens de laboratoire. Ils apprennent sur l'animal vigile (souris, rat, lapin) les gestes de préhension et de contention et les méthodes de base d'administration de substances ou de prélèvements. Ensuite, sur l'animal anesthésié et analgésié, ils procèdent à des prélèvements de liquides biologiques (sang), à des administrations par voie veineuse de différentes substances pharmacologiques afin d'en visualiser

les effets sur l'organisme entier. Ces manipulations permettent d'approcher et d'explorer ces grandes fonctions physiologiques et leur régulation telles que la pression artérielle, la glycémie, la diurèse. Ainsi, les étudiants apprennent à exploiter des modèles d'étude *in vivo* développés dans les laboratoires de recherche et de développement.

Ces TP sont réalisés après les avoir sensibilisés à la réglementation encadrant l'expérimentation animale.

L'approche de la manipulation animale répond à une démarche progressive initiée par l'enseignement de l'anatomie des rongeurs, des bases de la physiologie, de la réglementation encadrant l'expérimentation animale. Dans un second temps, les différentes étapes pratiques des manipulations sont commentées pas à pas à l'aide d'observation de photos. Des démonstrations sont réalisées par les enseignants avant que les étudiants, encadrés par les enseignants et les techniciens habilités, ne commencent par eux-mêmes la préhension, la contention et l'anesthésie/analgésie sur des animaux vigiles. Les rats sont anesthésiés et analgésiés selon la réglementation et sont, sauf pour la procédure d'apprentissage de contention, préhension, administrations et prélèvements non invasifs mis à mort en fin de séance.

Les animaux de chaque espèce sont hébergés dans une animalerie conventionnelle assurant toutes les conditions optimales pour leur bien-être (température, hygrométrie, cycle jour/nuit) pour chaque espèce ainsi que des objets d'enrichissement leur permettant d'exprimer un comportement naturel.

Pour les 160*5=800 étudiants concernés sur 5 ans, le nombre total d'animaux utilisés pour 5 ans est de 2065 rats, 360 souris qui sont réutilisées dans un autre projet (autorisation n°APAFIS#6597-2016090110521613) et 50 lapins qui sont également réutilisés dans un autre projet (hors autorisation). Afin de réduire le nombre d'animaux, le plus souvent, les étudiants travaillent en binôme. Les souris et les rats sont des animaux de réforme correspondant à des invendus ou anciens reproducteurs (-trices) vendus moins chers par des éleveurs agréés.

13577 La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une pathologie complexe et hétérogène, avec de nombreux sous-types porteurs de combinaisons de mutations particulières. Cette pathologie est caractérisée par un blocage de différenciation et la prolifération de cellules immatures qui envahissent la moelle osseuse. De nombreux progrès ont récemment été apportés dans la caractérisation moléculaire, génomique et dans l'analyse de l'hétérogénéité cellulaire des LAM. Ces études ont permis une meilleure stratification des patients. Cependant, ces données n'ont pas apporté de changements majeurs dans le traitement et la prise en charge des récurrences des patients, à l'exception d'une catégorie particulière de la maladie, la leucémie aiguë promyélocytaire, laquelle ne représente qu'environ 10% des cas. A la récurrence, les cellules leucémiques sont en général résistantes au traitement initial. Les résistances sont les causes majeures de l'échec thérapeutique. Il y a donc un besoin urgent de traitements alternatifs pour prendre en charge les résistances primaires et les récurrences dans les LAM.

Dans ce contexte, l'objectif et l'originalité de cette demande est de développer des modèles précliniques spécifiques de la LAM à partir des cellules primaires d'un même patient au diagnostic et à la rechute. Ces patients appariés auront l'avantage de représenter des modèles, le plus proche possible, de la pathologie et de la problématique clinique. La méthodologie que nous souhaitons mettre en place est donc basée sur la xénogreffe de cellules leucémiques humaines à des souris immunodéficientes. Il s'agit en effet d'une approche bien décrite et reconnue dans la littérature du domaine et il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode plus satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale pour cette étape préclinique. Nous pensons ainsi que cette biobanque constituerait le modèle préclinique à même de « mimer » l'hétérogénéité de la maladie observée chez les patients mais aussi de prédire la réponse thérapeutique au diagnostic de la maladie et au moment de la rechute du patient. Ces modèles précliniques au diagnostic et à la rechute, permettront aussi à terme de notamment tester différentes stratégies thérapeutiques innovantes ou de caractériser et de lutter contre les phénomènes de résistances aux chimiothérapies.

Nous utiliserons la méthode des 3 R (Réduction, Raffinement et Remplacement) pour réduire à son minimum le nombre d'animaux tout en conservant la diversité moléculaire de la LAM. Ce dernier point sera crucial lors de futures études visant à prédire la réponse thérapeutique via l'utilisation des différents modèles de leucémies ainsi établis. Ce projet d'établissement d'une banque de xénogreffes nécessitera donc 520 souris immunodéficientes de type NSG. De plus, dans un souci de raffinement, la détection précoce et encore asymptomatique du développement leucémique se fera par cytométrie de flux à partir de prélèvements sanguins réalisés sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Les animaux seront suivis quotidiennement. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée à mener en fonction d'une grille de score de douleur spécifique de ces modèles de pathologies hématologiques.

Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions de leur hébergement, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 5 afin de respecter leur instinct grégaire.

13578 La maladie de Parkinson (MP) est due à une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN) et de l'aire tegmentale ventrale (ATV). Cette lésion neuronale est responsable des troubles moteurs caractéristiques de cette pathologie. Cependant d'autres troubles non-moteurs sont associés à cette maladie. Nous nous proposons d'étudier les addictions aux traitements dopaminergiques et la douleur associée à cette pathologie. En effet, le traitement médicamenteux de la MP repose sur la restauration de la transmission dopaminergique par la L-dopa, précurseur de la dopamine et par des agonistes dopaminergiques agissant sur les récepteurs dopaminergiques de la classe D2R et D3R. Ce traitement est partiellement efficace pour la restauration du déficit moteur au cours des premières années de la maladie. Cependant au cours du traitement apparaissent des comportements addictifs (addiction aux médicaments dopaminergiques, hypersexualité, addiction aux jeux, addictions aux achats impulsifs...). Ces addictions résulteraient d'une hyperactivité du système dopaminergique méso-cortico-limbique encore appelé circuit de la récompense liée à la stimulation anarchique de ce système par les traitements dopaminergiques. Ce circuit au niveau de l'ATV et se projette au niveau de différentes structures qui sont le noyau accumbens (NAc), le septum, l'amygdale et le cortex préfrontal. Les manifestations addictives observées chez les patients parkinsoniens traités aux agonistes dopaminergiques ressemblent bien à celles observées chez les utilisateurs chroniques de drogues telles que la morphine, les amphétamines ou la cocaïne. Ces drogues stimulent l'activité des neurones de l'ATV et augmentent leur sécrétion de dopamine, en particulier au niveau du NAc. Le but de notre travail est d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les traitements dopaminergiques provoquent ces comportements. Nous nous intéresserons en particulier aux effets aigus et chroniques des agonistes dopaminergiques (L-dopa, D2R, D3R), chez le rat ayant subi des lésions bilatérales de l'AVT et/ou de la SNc (lésion due à l'injection de la toxine 6-hydroxydopamine). 2- La douleur neuropathique constitue un trouble majeur des manifestations non motrices de la MP et y est de loin la plus fréquente (68-85%). Malheureusement, à l'heure actuelle, le traitement de la douleur neuropathique est souvent très peu satisfaisant, principalement en raison de l'efficacité limitée des traitements médicamenteux disponibles et du manque de compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant ce symptôme. Nos études préliminaires ont montré que la déplétion centrale en dopamine, produisait une douleur neuropathique (allodynie mécanique dynamique) chez les rats lésés. Ces travaux ont suggéré la mise en jeu d'un mécanisme segmentaire local produisant une sensibilisation centrale qui est responsable de la douleur neuropathique. Le but de nos travaux est d'explorer les relations de causalité qui pourraient exister entre la déplétion centrale en dopamine, suite à la lésion de la SN et/ou de l'ATV, et les mécanismes segmentaires responsables de la douleur neuropathique. Par ce que nous souhaitons étudier dans leur intégralité les mécanismes cellulaires, moléculaires et comportementaux sous-tendant les addictions et la douleur observés cliniquement chez les patients parkinsoniens, nous faisons recours au modèle animal afin de mimer au mieux ce qui se passe chez l'homme. Nous utiliserons un nombre total d'animaux de 346. En fin, nous essayerons toujours de réduire au minimum le nombre d'animaux de chaque groupe (maximum 6 animaux par groupe),

aussi nous utiliserons les données de(s) groupe(s) contrôle(s) pour des expériences plus ou moins comparables. Aussi, durant leur hébergement, les animaux auront des éléments d'enrichissement adéquats dans leurs cages, et afin de minimiser la souffrance et l'angoisse des animaux, les opérations chirurgicales se feront sous anesthésie et sur un tapis chauffant.

13579 La pratique d'une activité physique (AP) régulière et modérée représente aujourd'hui un élément clé dans la prise en charge des patients atteints de cancer. L'AP induit des bénéfices sur la qualité de vie, la fatigue, les capacités physiques mais aussi sur l'évolution et la récurrence de certains cancers comme le cancer de la prostate (CaP). Malheureusement, les recommandations existant à l'heure actuelle restent trop générales et sont identiques à celles de la population générale, ne prenant en compte ni la pathologie, ni les traitements. Notre équipe a récemment démontré dans des modèles murins porteurs d'un cancer de la prostate qu'un entraînement sur tapis roulant permettait de ralentir la croissance tumorale mais aussi d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie (RT). A l'inverse, une AP spontanée sur roue ne module ni la croissance tumorale, ni la réponse à la radiothérapie, soulignant l'importance des modalités d'AP dans les effets observés.

Dans ce contexte, notre projet vise à déterminer l'impact de trois intensités d'exercice différentes sur la croissance de tumeur de la prostate dans un modèle de rongeur et identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents, plus particulièrement les modulations de la vascularisation tumorale et du système immunitaire. De plus, nous souhaitons distinguer les effets aigus (exercice isolés) des effets chroniques (effets sur le long term) de l'activité physique.

Pour cela, des souris mâles seront randomisées en six groupes de 15 souris par groupe pour l'étude activité physique chronique et en six groupes de 15 souris par groupe pour l'étude activité physique aiguë (soit 180 souris au total).

La croissance et la vascularisation tumorales seront mesurées chaque semaine. Une évaluation de la force et de l'endurance musculaire sera réalisée au début et à la fin du protocole. Afin de distinguer les effets aigus des effets chroniques induits par l'activité physique, les souris de l'étude 1 (effet de l'activité physique chronique) seront euthanasiées 48 heures après le dernier exercice physique, tandis que les souris de l'étude 2 (effet de l'activité physique aiguë) seront euthanasiées 1 heure après le dernier exercice. Différents prélèvements seront réalisés en vue de diverses analyses moléculaires.

Les résultats de ce projet permettront de mieux définir l'impact d'un exercice physique sur la croissance du cancer de la prostate et ce, en fonction de son intensité. Ils pourront également améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires activés en réponse à ces différentes modalités, conduisant in fine à préciser les recommandations à destination des patients.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R.

- Remplacement : ce modèle expérimental *in vivo* est nécessaire pour comprendre les changements moléculaires induit par la combinaison de l'AP et de la RT. En effet, l'effet de l'AP notamment ne peut être remplacé par un modèle *in vitro*.

- Réduction : Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire permettant d'être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Dans notre étude, 180 souris mâles seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques.

- Raffinement : les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le Raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux afin que les conditions de bien-être sont respectées. De plus, des mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (notamment avec l'utilisation d'anesthésie, d'analgésie et de tapis chauffant).

13580 La plasticité cérébrale est la capacité du système nerveux à modifier, tout au long de sa vie, sa structure et son fonctionnement, en réaction à la diversité de l'environnement. Ces changements

se produisent à différents niveaux du système nerveux : structures moléculaires, changements dans l'expression des gènes, et changements neuro-biochimiques. La neuroplasticité permet aux neurones de se régénérer anatomiquement et fonctionnellement et de former de nouvelles connexions synaptiques. Elle représente la capacité du cerveau à se rétablir et à se restructurer. Grâce à la plasticité synaptique, nous sommes capables d'apprendre ou d'avoir des souvenirs.

Dans ce projet, nous nous concentrerons principalement sur deux points spécifiques de la plasticité cérébrale : la neurogenèse adulte et la plasticité structurelle.

La neurogénèse adulte joue notamment un rôle dans la régulation de nombreux processus cognitifs comme la mémoire ou dans certains désordres psychiatriques tels que la dépression et le stress post-traumatique. Chez l'Homme, une partie de l'hippocampe est un des lieux privilégiés de la neurogénèse adulte. L'hippocampe contient des cellules qui peuvent soit se diviser pour maintenir leur population, soit, en fonction de signaux spécifiques, se différencier en neurones. Le neurone « nouveau-né » sera intégré dans les réseaux hippocampiques et participera à la régulation de l'activité neuronale de cette structure. L'hippocampe s'est également révélé être une structure importante pour l'étude de la plasticité structurelle en raison de son emplacement anatomique, des caractéristiques physiologiques des neurones qui le composent, de sa plasticité et de son rôle dans la création de la mémoire.

Les défauts de neurogénèse et de plasticité structurelle semblent être liés à différentes pathologies telles que la dépression ou même les maladies neurodégénératives. Différentes études sur la plasticité synaptique ont montré des avancées importantes dans l'amélioration de la récupération après une lésion cérébrale. Une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait donc ouvrir à de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Dans notre laboratoire, nous étudions depuis plus de dix ans la protéine CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor), Elle fait partie d'une famille de protéines qui renforcent l'interaction cellule-cellule. CAR est présent dans les neurones « nouveau-né » de l'hippocampe et dans les synapses. Nous avons constaté que l'absence de CAR entraîne des modifications du comportement. Nous savons aussi que l'inflammation peut influencer l'équilibre entre la genèse et la dégénérescence des neurones. Nous avons montré que dans les cerveaux sains ou stimulé par une molécule mimant des infections, l'expression de CAR est diminuée dans les neurones nouveau-nés et dans les synapses. De plus, lors des premiers stades d'apparition de la maladie d'Alzheimer, les taux de CAR sont considérablement réduits dans l'hippocampe. Nos études nous ont amenés à proposer que la perte de CAR contribue aux défauts cognitifs.

Ici, nous explorerons plus en détails la fonction de CAR pendant la neurogénèse adulte et la plasticité structurelle dans différentes structures du cerveau. Pour cela, nous utiliserons un système qui nous permettra de contrôler l'expression de CAR à des moments spécifiques. En utilisant cette approche, nous pourrions mesurer l'impact de la réduction de CAR afin de mieux comprendre son rôle dans le cerveau adulte. Nous prévoyons d'utiliser 180 animaux, la moitié d'entre eux sont des mâles, l'autre moitié des femelles. Pour le volet « réduction », nous avons fait une analyse bibliographique poussée afin de définir les expériences à réaliser et nous avons mené une longue réflexion avec notre statisticien pour définir au mieux le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé. Nous étudierons le rôle de la protéine CAR dans la plasticité du cerveau adulte. Nous savons que la plasticité neuronale joue un rôle important dans la récupération et le pronostic des différentes pathologies du cerveau. Nous savons aussi que les pathologies cérébrales telles que les maladies neurodégénératives, les accidents vasculaires cérébraux ou les maladies mentales n'affectent pas de manière identique les hommes et femmes, jeunes et vieux. Pour cette raison, nous voulons utiliser des femelles et des mâles, jeunes et vieilles souris dans notre étude car dans la majorité des études, seuls les mâles jeunes ont été utilisés créant donc un biais important.

Pour le volet « raffinement », nous portons une attention toute particulière au bien-être des animaux. Nous avons une cellule du « bien-être animal » (SBEA : Structure chargé du Bien-Être Animal) qui vérifie quotidiennement le bien-être des animaux. Nous avons augmenté l'enrichissement du milieu avec des copeaux et des maisonnettes. Les protocoles sont soumis au comité d'éthique interne à notre institut et comportent notamment les points limites pour chaque expérimentation. Les

procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation définie par les dispositions européennes et nationales.

13581 En tant que prestataire de service, nous réalisons ce projet pour un de nos clients qui développe et commercialise des vecteurs de transfection, c'est-à-dire qui transfèrent des gènes ou des oligonucléotides (ARN) dans des cellules animales. Les modes d'administration sont multiples, par voie systémique ou locale. Dans le cadre de ce projet, ces vecteurs de transfection seront testés selon différents modes d'injection (sous-cutanée ou intraveineuse ou intramusculaire) en fonction de leur composition, afin de valider l'efficacité de transfection *in vivo* et l'absence de toxicité. Ces vecteurs sont des produits synthétiques contrôlés chimiquement et biologiquement. Leur utilisation couvre la recherche, les études précliniques et cliniques (utilisation de produit de grade GMP, Good Manufacturing Practices), ils sont par exemple testés dans le cadre de thérapies géniques pour traiter le cancer chez l'Homme.

- Remplacement : Dans le cadre de ses développements, de la production commerciale et des études de stabilité des produits précliniques et cliniques, notre client réalise des essais sur des modèles *in vitro*, ce qui permet de faire une pré-sélection des vecteurs et de réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés. Malgré cela les essais de transfection *in vitro* ne reflètent pas le comportement des produits *in vivo*, notamment en termes d'activité et de toxicité. Pour cela, l'administration par voie locale ou systémique *in vivo* est nécessaire pour permettre de valider l'activité et l'absence de toxicité des produits. Les tests d'activité sont limités à la souris, modèle actuellement le plus utilisés en recherche médicale pour la thérapie génique.

- Réduction : Chaque vecteur est validé comparativement à un produit référence déjà validé suivant le même protocole. Ainsi pour chaque protocole, 4 groupes de 6 souris sont utilisés : 2 groupes avec le vecteur contrôle et deux quantités de produit de transfection (une faible et une forte) et 2 groupes avec le vecteur à tester et 2 doses de produit. Sur les 5 ans de ce projet, au rythme de 4 vecteurs validés par an, un total maximal de 480 animaux devrait être utilisé.

- Raffinement : Les produits sont testés en transfert de gènes en utilisant un gène rapporteur dont l'expression est majoritairement localisée dans les poumons après une injection sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire, celle-ci étant réalisée sous anesthésie afin de réduire au minimum le stress induit chez les animaux. De plus, les tests préalablement faits sur ce type de vecteurs ne mettent pas en évidence de dommage quelconque subi par les animaux. La faible durée du projet et la faible probabilité de toxicité des vecteurs observées lors de projets antérieurs nous permet de nous assurer qu'il n'y a pas de dommages attendus chez les animaux de ces études.

13582 Le Tamoxifène est le traitement le plus fréquemment utilisé contre le cancer du sein. Il est également utilisé dans la recherche biomédicale pour contrôler l'activité de certaines protéines. Il a été récemment découvert que le traitement par Tamoxifène empêche l'inhibition de la neurogénèse dans le cerveau adulte lors de la neuroinflammation – un facteur majeur limitant la neurorégénération dans les maladies neurodégénératives. L'objectif de ce projet est d'identifier les mécanismes de cette activité bénéfique afin de proposer un traitement pour stimuler la neurorégénération et/ou retarder le processus neurodégénératif. Les procédures nécessaires à la réalisation de ce projet incluent des injections répétées de tamoxifène, et d'un inducteur de l'inflammation. Certains animaux recevront également des injections d'un marqueur des cellules en cours de prolifération.

Les données obtenues auront une répercussion immédiate sur les possibilités de traitement des maladies dégénératives associées à la neuroinflammation. Finalement, la compréhension du mécanisme par lequel le Tamoxifène influence la neurogénèse pourrait contribuer au développement de la médecine régénérative.

Il n'est pas possible de remplacer les modèles murins par un autre modèle animal car la neurogénèse dans le cerveau adulte est un processus extrêmement rare et complexe qui ne peut s'étudier que dans le contexte du cerveau entier *in vivo*. Dans une optique de REMPLACEMENT nous avons identifié *in vitro* (cultures cellulaires et analyses moléculaires du matériel biologique

provenant de la souris) les déterminants moléculaires et pharmacologiques de contrôle de la neurogénèse que nous allons étudier au cours de ce projet *in vivo*.

RAFFINEMENT:

Afin de réduire la souffrance et le stress subits par les animaux, notamment associés aux multiples injections, nous testerons dans une expérience pilote si les injections répétées de tamoxifène peuvent être remplacées par un traitement oral (tamoxifène dans la nourriture). Les injections intrapéritonéales répétées seront appliquées par alternance à différents endroits de l'abdomen (central et légèrement latéral du côté gauche ou droit). Pour limiter le stress et la douleur liés à l'injection, toutes les injections IP sont effectuées avec des aiguilles fines (G30 ou seringues pour injection d'insuline). Pour améliorer le bien-être animal qui peut être affecté par un état inflammatoire, nous allons utiliser une litière enrichie. Les animaux seront pesés quotidiennement pendant les injections. Le modèle de neuroinflammation utilisé dans ce projet a été optimisé au cours d'un projet précédent pour induire une faible neuroinflammation sans rupture de la barrière hématoencéphalique.

REDUCTION:

Afin de réduire le nombre d'animaux, nous allons les habituer à la contention pour diminuer le stress et l'hétérogénéité des résultats qui en découlent. Dans ce but nous allons manipuler les animaux 2 fois par jour pendant les 2 jours précédant l'expérience. Nous utiliserons aussi les mêmes animaux pour les tests comportementaux et pour certaines études moléculaires.

Au total 404 souris seront utilisées dans ce projet.

13583 Notre laboratoire développe des approches de médecine régénérative pour traiter les maladies sévères du foie avec des hépatocytes.

La greffe de foie est le traitement reconnu pour de nombreuses maladies du foie au stade terminal mais, il y a pénurie de foies donateurs. La transplantation d'hépatocytes isolés de foies donateurs est une alternative prometteuse à la greffe de foie. Cependant, elle est limitée par cette même pénurie croissante d'organes donateurs et par l'incapacité à amplifier les hépatocytes *in vitro*.

Pour pallier ces difficultés, un nouveau concept thérapeutique a émergé visant à utiliser des cellules souches pluripotentes (CSP) induites (hiPS) et embryonnaires (hES) humaines comme une source illimitée de cellules du corps, notamment les hépatocytes. En effet, la multiplication et la transformation des CSPs en hépatocytes peuvent être contrôlées et obtenus en laboratoire. C'est sur ces propriétés que reposent les espoirs en termes d'applications biomédicales : constituer un réservoir renouvelable de cellules pour réparer les organes malades. Les hépatocytes issus des CSPs (pStemHep) sont capables de se greffer dans le foie et de guérir des animaux immunodéficients atteints d'une insuffisance hépatique aiguë (IHA) induite par un composé hépatotoxique. Le foie a une capacité extraordinaire de régénérer spontanément à partir des hépatocytes matures résidents. Ainsi, dans le cadre du traitement des IHA, l'idée est de soutenir transitoirement le métabolisme hépatique pendant la phase critique de régénération de la masse hépatique minimale vitale. Une fois cette phase franchie, le foie assurera lui-même la survie et le rétablissement de l'animal. Lorsque l'atteinte du foie est trop sévère, et notamment lorsque sa capacité régénérative est déficiente, cette approche permettrait aux patients d'attendre une greffe de foie.

L'objectif de ce projet est de développer une approche basée sur les pStemHep pour traiter les IHA chez la souris. Les objectifs spécifiques seront (i) d'améliorer les fonctionnalités des pStemHep afin d'augmenter leurs performances thérapeutiques pour traiter les IHA et (ii) développer des stratégies d'immunoprotection des pStemHep pour empêcher leur rejet immunitaire chez les animaux immunocompétents.

Les procédures mises en place nous permettront d'optimiser la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Lorsque des données préliminaires sont disponibles, nous les utilisons pour limiter le nombre de groupes expérimentaux dans les étapes suivantes. Cela permet de réduire le nombre d'animaux impliqués. Nous avons estimé à 2500 le nombre maximum d'animaux nécessaires sur 5 ans (voir détail des groupes en annexes 1 & 2 et dans les procédures) mais nous limiterons les

groupes nécessaires dès que possible, et si cela est faisable nous transférerons certains animaux d'une procédure à une autre afin de limiter les groupes prévus, notamment pour la procédure 4.

Enfin, nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal: l'anesthésie des animaux est réalisée par inhalation d'un mélange isoflurane (3%)/air (débit 3 L/min). La douleur sera limitée par injection de buprénorphine 0,05mg/kg et de la lidocaïne 2,5% sera également appliquée avant laparotomie lors de la transplantation des cellules. Les animaux seront placés sur un tapis chauffant pendant l'opération et lors du suivi post-opératoire jusqu'à leur réveil. Enfin, les animaux recevront 2 injections quotidiennes de buprénorphine 0,05mg/kg jusqu'à la guérison (4 jours).

13584 La thrombose veineuse profonde (TVP) est une maladie fréquente, associée à un risque d'insuffisance veineuse sévère, dénommée syndrome post-thrombotique (SPT). Le SPT est dû principalement à la persistance de l'occlusion de la veine non recanalisée. La compression veineuse reste le seul traitement validé afin de diminuer l'intensité du SPT.

Ces dernières années ont vu émerger des techniques de recanalisation de la veine ayant pour but de prévenir le SPT. La thrombolyse pharmacologique ne s'est pas généralisée du fait des complications hémorragiques. L'objectif des thérapeutiques en développement est donc de permettre une recanalisation efficace de la veine thrombosée, sans traitement systémique afin d'éviter tout risque d'hémorragies majeures.

L'histotripsie est une technique ultrasonore récente, permettant de fragmenter de tissus biologiques à distance, grâce au déplacement d'un transducteur externe. Appliquée à la veine thrombosée, cette technique peut permettre la destruction du thrombus (appelée thrombotripsie) en de petits fragments, sans altération des tissus. Ceci autorise une procédure non invasive, locale, rapide, sans traitement pharmacologique associé.

Afin de permettre le développement d'un nouveau dispositif externe de recanalisation veineuse, il convient de s'assurer de la sécurité du dispositif. Les principaux risques identifiés sont l'effraction de la paroi veineuse et le risque d'une embolie pulmonaire par migration d'un volumineux fragment. Pour cela, l'évaluation *in vivo* nécessite un modèle animal avec une anatomie vasculaire comparable à celle de l'homme.

Du fait de la rigidification progressive du thrombus au cours du temps, nous souhaitons évaluer la capacité du dispositif à recanaliser un thrombus plus ancien, se rapprochant plus de la maladie humaine. L'objectif principal est la validation du dispositif de thrombotripsie en terme d'efficacité et de sécurité sur les risques d'altération veineuse et d'embolie pulmonaire dans un modèle porcin de thrombose veineuse subaiguë.

Méthodes

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous évaluons à 14 le nombre total de porcs nécessaires. Sous anesthésie générale profonde, une thrombose de la veine fémorale sera réalisée par obstruction veineuse par voie endovasculaire. L'occlusion sera maintenue 2h avec anticoagulation intraveineuse.

Après confirmation d'un thrombus occlusif, les porcs seront suivis 14 jours sous anticoagulation efficace. Durant cette période, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire avec surveillance des points limites.

A 14 jours, la thrombose sera réévaluée, et une recanalisation sera effectuée dans un groupe (7 porcs). Le réveil sera appliqué pour évaluation du suivi pendant deux semaines.

Au terme du second suivi de 14 jours, une phlébographie et une échographie-doppler seront réalisées sous anesthésie générale profonde sur l'animal en vie afin d'évaluer la perméabilité de la veine fémorale et les conséquences de la recanalisation veineuse à distance pour les groupe recanalisé et le groupe contrôle. Les animaux seront ensuite tous euthanasiés par surdosage anesthésique à la fin de la procédure.

Le critère principal d'efficacité est le taux de perméabilité de la veine fémorale chez les porcs recanalisés après 14 jours de suivi.

Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale profonde avec une analgésie préopératoire. Au cours du suivi, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire en charge du projet.

Ce travail permettra de valider l'efficacité et l'innocuité du dispositif ultrasonore non invasif de recanalisation veineuse, dans la perspective d'un développement clinique novateur de la prise en charge de la TVP chez l'homme.

13585 L'obésité est un problème de santé publique dont l'incidence est de 15% en France, soit environ 6 millions de citoyens. L'obésité est une maladie mortelle et ampute l'espérance de vie de 20 ans suite aux complications induites (diabète, hypertension artérielle, cancer, dyslipidémie etc...).

Le traitement médical est inefficace et seul le traitement chirurgical est efficace à long terme. Environ 60 000 procédures de chirurgie de l'obésité (gastrectomie en gouttière ou sleeve-gastrectomie ; gastric bypass, duodenal switch, anneau) sont réalisées par an en France et sont à l'origine de 2 à 10% de complications et de 0,5 à 2% de décès. La complication la plus redoutée est la fistule digestive (fuite du liquide digestif au niveau des sutures digestives) qui est à l'origine d'infections de la cavité abdominale et expose au risque de décès dans 30% des cas s'il n'y a pas de traitement réalisé en urgence.

La fuite digestive (fistule) se voit dans 2% des cas et son traitement est long et nécessite plusieurs mois d'hospitalisation avec de nombreuses interventions endoscopiques et chirurgicales et de nombreux examens radiologiques et ne permet le tarissement de la fuite que dans 40% des cas.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la cicatrisation de la fistule par la thérapie cellulaire.

Nous avons mis au point un modèle de fistule digestive gastrique chirurgicale (résection gastrique : gastrectomie en gouttière accompagnée d'un orifice fistuleux (trou de 2,1mm de diamètre)) chez le rat Zucker obèse de sexe mâle de 9 à 10 semaines pour évaluer une technique visant à améliorer la cicatrisation de l'estomac après chirurgie.

Notre étude nécessite 112 rats Zucker (c'est-à-dire deux groupes de 48 rats chacun et 16 donneurs) : le premier groupe, témoin, de 48 rats bénéficiera du traitement habituel (toilette de la cavité abdominale et la mise en place d'un drain au contact de la fuite gastrique) et le second groupe, test, de 48 rats bénéficiera en plus du traitement habituel, de la mise en place d'un mélange de plasma riche en plaquettes (PRP) et de cellules souches mésenchymateuses (CSM) au niveau de l'orifice fistuleux (le PRP potentialise l'effet des CSM). Toutes les semaines, nous procéderons à l'euthanasie de 25% des rats de chaque groupe témoin et test et nous prélèverons leur estomac afin de comparer l'évolution de la cicatrisation dans chaque groupe (procédure 2).

Les prélèvements de sang pour extraire le PRP et les prélèvements de moelle osseuse pour concentrer les cellules souches par centrifugation seront réalisés chez un troisième groupe de 16 rats qui seront euthanasiés préalablement (procédure 1).

Du point de vue du raffinement, des mesures d'anesthésie et d'analgésie seront mises en place lors des interventions, à savoir : une administration d'antalgique (buprénorphine 0.035mg/kg/j sous cutané), d'anti-inflammatoire (carprofène 4mg/kg/j sous cutané) et d'une antibiothérapie préventive (baytril 10mg/kg/j sous cutané). Les rats seront suivis de manière quotidienne et une attention particulière sera portée aux signes de souffrance et au bien-être. En fonction des scores, les animaux pourront être traités de façon symptomatique (réhydratation, antalgiques, antibiotiques). D'autre part, les animaux seront mis dans des cages enrichies selon la réglementation et à raison de 3 rats par cage.

Concernant le remplacement : La cicatrisation est un phénomène complexe faisant intervenir différents acteurs cellulaires dont les interactions, qui ont lieu dans le contexte physiologique très particulier du système digestif, ne peuvent pas être reproduites *in vitro* et l'évaluation de la cicatrisation ne peut être réalisée que par l'euthanasie de l'animal et l'étude anatomo-pathologique de l'estomac.

Pour la réduction du nombre de rats utilisés, nous avons calculé le nombre nécessaire à la validité de notre preuve de concept par un test statistique : test prédictif : test de Montecarlo, et nous avons réalisé une large recherche bibliographique afin de nous assurer la non duplication des protocoles expérimentaux déjà réalisés.

Ainsi, ce travail a pour objectif de raccourcir les durées de cicatrisation de la fistule chez le rat grâce à la thérapie cellulaire permettant alors d'utiliser, à ce terme, ce protocole chez l'Homme.

13586 Chez les porcs en croissance, une des principales réponses physiologiques au stress thermique est la réduction de la prise alimentaire (pouvant aller à plus de 50 % de l'ingéré volontaire), probablement pour limiter la production de chaleur. La restriction alimentaire a des effets immédiats sur le métabolisme et la croissance des porcs. Durant les périodes de restriction alimentaire (liées à la chaleur ou à d'autres contraintes), l'animal doit ajuster l'allocation des nutriments entre maintenance et croissance pour maintenir l'homéostasie. L'animal efficient est celui qui est capable de réorienter, ou de déplacer l'équilibre entre ses voies métaboliques, selon les contraintes du milieu d'élevage. La réponse à la restriction alimentaire est variable au sein d'une population et une partie de cette variabilité pourrait avoir une base génétique. Une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et génétiques liés à l'allocation des nutriments permettrait d'améliorer les programmes de sélection et les pratiques nutritionnelles des éleveurs pour limiter l'impact économique et améliorer le bien-être durant les périodes de restriction alimentaire. Afin de se rapprocher des conditions d'élevage classique et permettre une analyse des paramètres génétiques grâce à un nombre suffisant d'individus, nous souhaitons mettre en place un protocole de restriction alimentaire chez des animaux élevés en groupe dont la consommation sera suivie grâce à des distributeurs automatiques d'aliment (DAC). Les objectifs sont d'étudier: 1) les effets d'une restriction alimentaire d'une durée de 21 jours durant l'engraissement sur les performances de croissance, le comportement alimentaire, le métabolisme et le microbiote intestinal et 2) la différence de réponse entre deux races, la race Créole, bien adaptée aux conditions tropicales difficiles et la race Large White, sélectionnée pour sa productivité.

Le protocole présenté consiste en 2 lots de porcs en croissance âgés de 14 semaines : le premier lot est soumis à une restriction alimentaire de 30% pendant 3 semaines tandis que le second lot (contrôle) est nourri ad-libitum. Une restriction alimentaire de 30% permet à l'animal de couvrir la totalité de ses besoins d'entretien et environ 50 % des besoins de croissance. Ces conditions de restriction sont similaires à la réalité de certains élevages tropicaux en plein air ou en système polyculture-élevage. Les 2 lots d'animaux sont ensuite alimentés ad-libitum pendant 6 semaines. Les animaux seront nourris par un distributeur automatique de concentré (DAC) permettant de suivre leur consommation individuelle. Nous mesurerons : les consommations moyennes et le comportement alimentaire, le poids, l'épaisseur de gras dorsal, les paramètres de thermorégulation, les métabolites sanguins et le microbiote intestinal (via le prélèvement de fèces). Afin de réaliser une étude génétique des caractères, le nombre d'animaux utilisé sera de 720 sur une période totale de 5 ans, soit environ 150 animaux par an.

La règle des 3R a été prise en considération: - Remplacement: l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter les réponses physiologiques, génétiques et comportementales - Réduction: un calcul du nombre d'animaux nécessaires par un test de puissance a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre minimum d'individus à inclure en théorie dans le projet pour une bonne précision ($\pm 0,01$) des paramètres génétiques. Un calcul des composantes de variance et des paramètres associés (génétique, environnemental, résiduelle, héritabilités et corrélations) des différents caractères sera réalisé après 2. 5 ans pour réévaluer le nombre d'animaux nécessaire. - Raffinement: les conditions d'hébergement sont raffinées par des installations prenant en compte l'enrichissement du milieu des animaux et où le personnel est formé à l'expérimentation animale, aux notions de santé des animaux et aux notions de points limites pour favoriser leur bien-être. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement. Les animaux soumis à une restriction alimentaire seront particulièrement suivis. Ainsi des comportements anormaux (prostration, absence ou faible ingestion) pourront permettre la détection précoce des pathologies et de situations de mal-être. Les prises de sang seront réalisées par des personnes compétentes et formées pour réaliser

ces prélèvements sanguins en moins d'une minute entre la contention, le prélèvement sanguin, la désinfection et la libération de l'animal. Les animaux prélevés seront observés afin de prévenir d'éventuelles complications.

13587 La maladie d'Alzheimer est classée parmi les tauopathies. Son diagnostic et son traitement sont deux défis majeurs de santé publique. Bien que cette maladie soit bien caractérisée, notamment avec l'observation de l'agrégation de la protéine Tau dans les cellules du cerveau, ses causes restent inconnues. Le projet présenté ici a pour but de mieux comprendre comment les cellules voisines des neurones, les astrocytes, sont affectées par la pathologie. L'étude de la réaction des astrocytes dans les tauopathies et l'évaluation de leur dysfonction pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies en général.

Pour ce faire, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées chez lesquelles il est possible d'induire l'agrégation de la protéine Tau et de rendre les différentes cellules du cerveau fluorescentes afin de suivre leur évolution au cours de la progression de la pathologie. Le recours à l'animal reste indispensable pour notre projet car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau. En particulier, les systèmes en culture ou synthétiques ne permettent pas d'analyser les interactions structurelles et fonctionnelles entre les différents types de cellules qui sont ici au cœur du projet.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et de notre élevage interne. Nous prévoyons d'utiliser 550 animaux lors des expériences qui seront menées pendant les 5 années de l'étude. Une première procédure visera à améliorer la prise en charge de la douleur suite aux différents protocoles chirurgicaux prévus, pour permettre la surexpression de protéines pathologiques et de réaliser l'imagerie *in situ* du fonctionnement du cerveau. Toutes ces chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale avec une prise en charge de la douleur péri et post-opératoire définie lors de la première procédure, et approuvée par une équipe vétérinaire.

L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

13588 Les maladies psychiatriques touchent plus d'un adulte sur 4. Ces maladies restent mal traitées car mal comprises. Parmi elles, les troubles du spectre autistique (TSA) sont en forte augmentation depuis ces 20 dernières années (prévalence actuelle 1%) mais les mécanismes physiopathologiques impliqués sont encore largement inconnus. Les TSA se caractérisent non seulement par des troubles du comportement, liés à des anomalies de connectivité neuronale dans le cerveau, mais aussi par des troubles gastro-intestinaux dont les causes sont inconnues mais qui pourraient impliquer le système nerveux entérique (SNE). Les données actuelles suggèrent que les altérations du microbiote intestinal contribueraient à la fois aux troubles comportementaux et gastro-intestinaux des TSA. Ce projet propose d'examiner pour la première fois si ces altérations du microbiote intestinal observées dans les TSA induisent des défauts de connectivité du SNE.

Il s'agira ainsi d'étudier si des préparations fécales issues de patients TSA, en comparaison de celles issues de sujets contrôles, induisent des anomalies de connectivité du SNE dans un modèle animal murin. Pour cela, les souris recevront dans un 1^{er} temps un traitement d'antibiotiques à large spectre par voie orale, diminuant ainsi drastiquement la charge bactérienne intestinale. Elles seront par la suite traitées avec des préparations fécales issues de patients TSA ou sains, ou des métabolites bactériens. Les animaux seront observés et soumis à différents tests comportementaux nous permettant ainsi de faire le parallèle entre les troubles observés *in vivo* et les troubles fonctionnels observables *ex vivo*.

Ce projet sera réalisé en tenant compte du principe des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter toutes sources d'angoisse et de souffrance, l'instillation des préparations fécales sera effectuée sous anesthésie à l'isoflurane. Le bien-être des souris sera surveillé tout au

long de l'étude tous les jours, avec une mise en place d'un enrichissement par fricotis, et en évaluant l'état général des animaux, et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance les animaux seront euthanasiés (Raffiner). La corrélation *in vitro-in vivo* n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude et il n'y a pas d'alternative au Remplacement.

Les expériences seront réalisées en plusieurs fois et ce projet nécessitera 380 animaux (souris C57Bl6) maximum.

13589 La surdité DFNB9 est une surdité profonde héréditaire causée par une mutation dans le gène OTOF codant pour l'otoferline. Cette surdité représente 3% des surdités non syndromiques autosomiques récessives. Il n'existe aucun traitement curatif de cette surdité seulement une possibilité d'implantation cochléaire dont l'efficacité est partielle. Des résultats, obtenus chez la souris d ficiante en otoferline, indiquent que cette surdité pourrait être corrigée par thérapie génique (par injection d'un vecteur porteur du gène de l'otoferline). Ces résultats, bien que très encourageants, ne permettent pas d'envisager immédiatement des essais chez l'Homme (essais cliniques) : certaines caractéristiques du modèle murin comme la taille et le développement de l'oreille interne ainsi que les fonctions des gènes chez la souris diff rent significativement de ceux des humains. De par des travaux antérieurs, le modèle primate non-humain apparait comme le plus adapté pour l'étude des pathologies auditives. En plus des correspondances anatomiques et fonctionnelles, le modèle de primate non-humain permet aussi de tester la faisabilité d'une injection locale équivalente à celle qui serait pratiquée chez l'Homme. Certains aspects portant sur l'administration par voie chirurgicale, et la technique de prélèvement et d'histologie de l'os cible (l'os temporal) ont déjà été validés à l'aide de tests *ex vivo*. Ceux-ci ont pu être réalisés dans le cadre d'autopsies de projets précédemment validés. Le but de ce projet est de valider la technique d'injection et la qualité de transduction du vecteur AAV2 chez le primate non-humain sain afin de pouvoir envisager l'application chez l'humain atteint de surdité DFNB9.

Remplacement : le recours à l'animal est nécessaire car aucune méthode alternative qui reproduise les caractéristiques fonctionnelles de l'ouïe n'existe actuellement. Nous souhaitons aussi recourir à un modèle animal dont les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de l'ouïe sont les plus proches de celles chez l'Homme pour tester et optimiser la spécificité et la sécurité des vecteurs qui ont donné des résultats prometteurs dans le modèle murin.

Pour cela nous utiliserons des techniques électrophysiologiques couramment utilisées en otologie, faisant appel aux potentiels évoqués auditifs (PEA) mais également histologiques après prélèvement des os temporaux. Les PEA permettent d'obtenir le seuil auditif des animaux de façon non-invasive. L'ensemble de ces travaux nécessitera un total de 6 macaques cynomolgus, nés et élevés en captivité dans des établissements autorisés. Réduction : ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats. Raffinement : toutes les interventions de chirurgie et d'imagerie sur les animaux se feront sous anesthésie générale, renforcées si nécessaire par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires appropriés. La température de l'animal est maintenue par un matelas chauffant. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*. Les études *in vitro* ont permis de tester l'efficacité de transduction des AAV dans des cellules humaines de l'oreille interne. Les études *in vivo* ont permis de sélectionner le sérotype avec le meilleur tropisme pour les cellules ciliées de l'oreille interne. Enfin, les études *ex vivo*, nous ont permis d'optimiser nos techniques de prélèvement et d'histologie afin de diminuer le nombre d'individu nécessaire pour répondre à nos questions. Six animaux seront ainsi utilisés dans ce projet. La mise en œuvre d'un suivi dans le temps non invasif (imagerie *in vivo* et tests électrophysiologiques sur animaux anesthésiés) permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites ont été prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Si tel était le cas, le vétérinaire de l'installation serait alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront au minimum par paire et un programme d'enrichissement adapté sera mis en place tout au long de l'étude.

13590 Le diagnostic de maladies infectieuses repose sur différents critères : signes cliniques, radiologiques, facteurs de risque associés... et sur les résultats de tests biologiques. L'utilité des tests biologiques est d'autant plus grande que certaines infections présentent peu ou pas de signes cliniques caractéristiques. Un large panel de tests biologiques existe de la culture de prélèvements à la recherche d'anticorps spécifiques dans le sang des patients. Cette recherche d'anticorps spécifiques est dans de nombreuses maladies infectieuses le seul moyen de diagnostiquer et secondairement traiter certaines maladies.

C'est dans le but de développer et commercialiser des tests diagnostiques de maladies pour l'Homme et/ou les animaux, que notre laboratoire Hospitalo-Universitaire collabore avec une entreprise. Nous souhaitons mettre au point des tests fiables, spécifiques et sensibles de recherche d'anticorps de pathogènes parasitaires comme *Echinococcus granulosus* et *Echinococcus multilocularis* responsables de maladies graves et parfois mortelles chez l'homme. L'utilisation d'antigènes est la clé de voute de la mise au point de test de recherche d'anticorps. En l'absence d'alternative de bonne qualité, l'obtention de tels antigènes passe par l'expérimentation d'animaux. Suite à l'injection d'agents infectieux, l'animal va développer un ou plusieurs kystes péritonéaux d'évolution chronique sans altération de l'état général. Ces kystes (constitués d'Antigène parasite), après purification, permettront de développer des tests sérologiques permettant, chez l'homme de faire le diagnostic de patient infecté.

Nos différentes expérimentations suivront le même schéma expérimental. Des gerbilles, quatre maximum par lot et par mois (en fonction des besoins de production de tests diagnostiques), seront infectées par le parasite *Echinococcus multilocularis* récupéré sur un animal antérieur (SOUCHE 007). Un total de 240 animaux sera utilisé dans ce protocole sur 5 ans. Les gerbilles infectées ne développeront aucun signe clinique d'évolution de la maladie jusqu'à l'obtention de kystes péritonéaux de taille croissante (kyste visible à 6-8 semaines). Post mortem, ces antigènes seront récupérés, une partie infime permettra le passage à un autre lot d'animaux et la partie principale servira à la production d'antigène pour le développement de test sérologique. Les seules procédures réalisées sur l'animal vivant correspondront à l'inoculation inaugurale par voie intrapéritonéale et leur suivi grâce à des pesées au minimum bi-hebdomadaires.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2 à 4) ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. Ces manipulations seront faites par du personnel compétent afin d'éviter au maximum le stress et la douleur des animaux.

Notre objectif, dans un premier temps, est de répondre à une forte demande des médecins spécialistes d'avoir des tests fiables permettant le diagnostic d'échinococcoses dues à *E. granulosus* (maladie = Kyste hydatique) et à *E. multilocularis* (maladie = Echinococcose alvéolaire). Ces deux pathologies sont graves puisque, chez l'homme, le seul traitement non palliatif est l'opération chirurgicale par exérèse de la lésion parasite.

13591 La radiothérapie et la chimiothérapie sont les principaux traitements disponibles en oncologie. Leur efficacité repose sur leur toxicité cellulaire, plus forte pour les cellules cancéreuses. Ils sont néanmoins accompagnés d'effets secondaires lourds, et sont parfois inefficaces.

Le système immunitaire, qui défend notre organisme contre les agents pathogènes (bactéries, virus...), est capable dans certains cas de reconnaître les cellules cancéreuses comme des cibles et de les éliminer. Cette réponse est efficace et spécifique, mais elle est généralement bloquée chez les patients atteints d'un cancer par des points de contrôle ou checkpoints. Ces dernières années, la possibilité d'inhiber ces checkpoints a permis de libérer une réponse immunitaire anti-tumorale

efficace et conduit à des résultats thérapeutiques positifs chez des patients présentant un pronostic défavorable.

Néanmoins, cette réussite médicale n'est pas totale, puisque certains patients n'y sont pas sensibles. L'enjeu est donc d'identifier d'autres leviers permettant le déclenchement d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

La radiothérapie peut conduire spontanément au déclenchement d'une réponse immunitaire anti-tumorale : les cellules tumorales tuées par les rayons déclenchent une réaction du système immunitaire, par l'intermédiaire de plusieurs étapes plus ou moins connues. L'une d'elles est la production d'une protéine, l'interféron bêta (IFN- β). Notre laboratoire a montré que cette étape est limitée, dans certaines cellules immunitaires appelées myéloïdes, par une protéine appelée TRIM33.

L'objectif de ce projet est de déterminer s'il est possible d'inhiber TRIM33 dans les cellules myéloïdes, et si cette inhibition conduit à une plus grande production d'IFN- β après irradiation d'une tumeur, et donc à une meilleure efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale déclenchée par la radiothérapie. Si tel est le cas, nous pourrions envisager d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie chez des patients résistants, ou de diminuer les doses de traitement pour diminuer les effets secondaires.

Pour ce projet, nous avons besoin d'un système expérimental permettant d'étudier la croissance d'une tumeur en présence d'un système immunitaire fonctionnel, imposant un modèle animal. La lignée C57/Bl6 de souris de laboratoire présente en outre la possibilité d'étudier des modifications génétiques cruciales (délétion de Trim33, ou du récepteur de l'IFN- β), nous permettant ainsi de répondre à des questions clés dans cette approche. Elle nous permettra de plus de nous placer dans des conditions pré-cliniques pour la radiothérapie, à l'aide d'un irradiateur spécifique mimant pour les souris les irradiateurs utilisés en clinique. Des cellules tumorales seront injectées sous anesthésie à des souris saines, qui seront ensuite traitées par radiothérapie dans différentes conditions. Au cours de ces expériences, la croissance de la tumeur sera systématiquement observée, et limitée à une taille prédéfinie. Les souris seront soigneusement observées, et tout signe comportemental de mal-être sera pris en compte pour décider de l'arrêt du protocole. D'autre part, nous utiliserons des systèmes cellulaires *in vitro* pour répondre à toutes les questions ne faisant pas appel à un système immunitaire complet. Lorsque cela ne sera pas possible, nous réaliserons les expériences préférentiellement dans des conditions où les tumeurs seront de petite taille.

Le nombre d'animaux prévus pour ce projet a été réduite au maximum tout en conservant un effectif suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Dans ces conditions, nous avons calculé que ce projet demandera l'utilisation de 840 souris.

13592 Notre laboratoire met en place une FORMATION CONCEPTION ET RÉALISATION DES PROCÉDURES - Rongeurs. Cette formation réglementaire est obligatoire pour les personnes responsables de projet d'expérimentation animale demandant des autorisations pour mettre en place des procédures expérimentales sur des animaux. Cette formation implique des enseignements théoriques et pratiques autour de l'expérimentation animales. D'un point de vue pédagogique, l'apprentissage des principales techniques (administration, prélèvement, gestion de la douleur, mise à mort) nécessite l'utilisation de rongeurs (rats et souris). Les séances de travaux pratiques seront intégrées dans les modules suivants : 1) Module 7 : Mise à mort (euthanasie, procédures) ; 2) Module 8 : Procédures expérimentales : aspects théoriques et pratiques ; 3) Module 10 : Physiologie expérimentale sur animaux vivants et 4) Module 11 : Analgésie et anesthésie. Leurs objectifs seront dans un 1er temps de bien connaître les bonnes pratiques de manipulation des rongeurs, incluant l'enrichissement de leurs milieux d'hébergement. Les participants seront initiés aux principaux gestes techniques réalisés sur rats et souris (différentes méthodes de préhension et de contention dans le cadre de socialisation, pesée). Les séances viseront également à apprendre les techniques d'administration et de prélèvements (voire de biopsies) sur animaux vigiles les mieux adaptées. La gestion de souffrance (reconnaissance des signes) et de la douleur grâce à l'emploi adapté d'analgésiques et d'anesthésiques. Ensuite, les

participants apprendront les meilleures techniques de mise à mort des animaux (chambre à CO₂) et à effectuer des prélèvements d'organes post-mortem.

Pour ces séances, nous avons estimé qu'il serait suffisant de faire deux séances dans lesquelles chaque participant manipulera un seul animal : une séance avec rats Wistar (ou TP1) et une séance avec souris C57Bl6 (ou TP2). Pour la formation avec 8 participants encadrés par 2 formateurs par an, il sera utilisé 10 souris et 10 rats, soit au maximum 50 souris et 50 rats pendant 5 ans. Étant donné l'objectif de ce projet, aucun test statistique n'a été envisagé.

Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3 R. Nous avons Réduit l'utilisation des animaux au minimum (1 rat et souris par personne impliquée dans la formation). La formation s'inscrit également dans le cadre de Raffinement, car elle a pour objectif de former aux meilleurs gestes techniques d'administration et de prélèvement chez l'animal, et aux méthodes opératoires d'analgésie et de mise à mort les mieux adaptées aux rongeurs. La formation conception et réalisation des procédures – Rongeurs mise en place ici, inclura aussi des cours et travaux dirigés sur les méthodes alternatives, d'anatomie virtuelle et de travaux pratiques d'initiation sur des maquettes d'animaux, ceci correspondant au concept de Remplacement.

13593 La thérapie génique est une stratégie innovante consistant à transférer un ADN thérapeutique dans les cellules déficientes afin d'améliorer l'état clinique des patients. Pour véhiculer cet ADN jusque dans les cellules cibles, les vecteurs viraux adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Une seule injection d'AAVr peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique dans des modèles animaux et chez l'homme. Toutefois malgré quelques succès, l'efficacité du traitement peut être contrecarrée par l'apparition de réponses immunitaires induisant la destruction des cellules infectées par le vecteur annihilant tout bénéfice du traitement.

La réponse immunitaire se déroule en 2 phases, une première appelée réponse immunitaire innée suivie d'une seconde appelée réponse immunitaire adaptative. La réponse innée constitue la première ligne de défense contre les agents infectieux, elle est immédiate, non spécifique et peu efficace mais est une étape nécessaire à la mise en place de la réponse adaptative. Cette dernière est spécifique de l'agent infectieux et très efficace.

Peu d'études se sont intéressées à la réponse innée dans le cadre du transfert de gènes avec des AAVr. Un blocage de la réponse innée pourrait permettre de stopper le processus d'initiation de la réponse adaptative et empêcher l'hôte de développer une réponse immune contre le traitement de thérapie génique.

Les objectifs de notre projet sont de caractériser les interactions entre le système immunitaire inné et les AAVr de sérotypes 8 et 9 (très largement utilisés en clinique), d'évaluer leur impact sur la genèse de la réponse adaptative et sur le transfert de gènes puis de proposer de nouvelles stratégies d'immunomodulation de la réponse innée anti-AAV.

Dans cette optique nous proposons de concevoir des vecteurs comportant des séquences ADN immunomodulatrices appelées DIM qui inhibent les détecteurs de l'immunité afin d'enrayer la réponse innée déclenchée suite à l'injection du vecteur dans le cadre du traitement de la myopathie de Duchenne sur des rats atteints (rats DMDmdx) de souche Sprague-Dawley (SD/Crl). Cependant le contexte immunologique des rats DMDmdx étant complexe nous proposons une preuve de concept sur des rats sains de même souche avec un vecteur codant pour une protéine fluorescente (GFP). La souche SD/Crl a également été choisie pour sa capacité à développer une réponse immune anti-AAV (comme chez l'homme). Malheureusement étant donné que seulement 60% des rats injectés développent une réponse anti-AAV, pour avoir une puissance statistique suffisante, le nombre de rats par groupe devra être étendu à 10.

Au maximum le nombre de rat atteindra 140 répartis en 14 groupes de 10. Un premier groupe recevra du liquide physiologique (PBS), le second recevra le vecteur AAV8 GFP en intraveineuse, le 3ème recevra le même vecteur ainsi que la séquence DIM en IV, enfin le 4ème recevra un vecteur AAV8 GFP comportant la séquence DIM incorporée dans son génome. Si la preuve de concept est faite, nous reproduirons ces 4 groupes dans le modèle de myopathie de Duchenne DMDmdx avec

le vecteur AAV8 microdystrophine. En cas de succès nous suivrons la même méthodologie avec un AAV9.

Les protocoles envisagés comme l'administration d'AAVr sont des procédures déjà réalisées dans des modèles rongeurs avec une bonne tolérance générale. Une courbe de poids hebdomadaire ainsi qu'une inspection visuelle quotidienne des animaux seront réalisées. Tout signe clinique notable sera suivi par l'expérimentateur. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place selon la procédure d'injection. Des prélèvements sanguins se dérouleront sous anesthésie gazeuse de courte durée (environ 10 min). Les rats seront euthanasiés sous anesthésie gazeuse et analgésie entre 1 et 3 mois post injection. Le nombre d'animaux par groupe (n=10) est le minimum nécessaire pour assurer la reproductibilité et l'analyse des résultats par tests statistiques.

13594 L'objectif de ce projet consiste à mesurer la valeur nutritionnelle des matières premières (céréales, graines, tourteaux, coproduits, huiles, ...) qui entrent dans la composition des aliments destinés aux ruminants.

Pour bien formuler les aliments, les nutritionnistes utilisent des tables d'alimentation qui caractérisent les matières premières (MP) utilisées.

Cette matrice doit être mise à jour régulièrement car elle doit prendre en compte les variabilités annuelles (composition, origine) des MP et les nouveaux coproduits.

Si ce travail n'est pas réalisé, la table d'alimentation et donc la formulation sera en décalage avec la réalité du terrain, l'aliment sera mal valorisé par l'animal: il faudra une quantité supérieure d'aliment pour couvrir ses besoins, les rejets via les fèces et les urines voire les éructations (méthane) seront plus importantes, augmentant ainsi l'impact environnemental des élevages. Une mauvaise valorisation de l'aliment peut également entraîner une diminution du bien-être animal (perte d'état pendant la période de production laitière, risque d'acétonémie et de stéatose, ...). Cette caractérisation des MP est donc incontournable.

Ce projet scientifique permet aussi de rechercher des solutions nutritionnelles naturelles (huiles essentielles) pour un meilleur confort digestif des animaux.

Les connaissances acquises avec nos vaches fistules nous aident actuellement à accélérer le développement d'alternatives *in vitro* fiables qui pourrait se substituer aux études actuelles sur les vaches fistules.

Nous utilisons déjà un incubateur qui permet de limiter le nombre de vaches fistules. Dans ces essais *in vitro*, du jus de rumen est prélevé via la canule ruminale de nos vaches fistulées. Ce jus est ensuite mélangé à des solutions tampon et nutritive, mis en seringue avec un échantillon de MP puis dans un incubateur. Cette technique *in vitro* nous permet de mesurer la valeur énergétique des MP. Mais ces techniques *in vitro* ne permettent pas une détermination précise de la digestibilité d'autres nutriments, notamment celle de la protéine végétale qui est primordiale en nutrition animale. Ainsi, la mesure *in vivo* reste indispensable.

Un essai dure 1 semaine. Une vingtaine d'essais sont menés chaque année, donc une centaine sur les 5 ans, avec 10 vaches tarées fistulées.

Pour réaliser une digestibilité ruminale, la manipulation consiste à introduire des sachets qui contiennent des échantillons de quelques grammes des MP, dans le rumen via la canule ruminale. Ces sachets incubent dans le rumen pendant quelques heures. Après incubation, les sachets sont, à différents intervalles, retirés, rincés, séchés, pesés puis les résidus de MP sont broyés pour être ensuite analysés en laboratoire.

Pour limiter la sollicitation physiologique, les vaches sont tarées. Leur durée de vie peut atteindre 20 ans vs 5-6 ans pour une vache laitière en production.

Les vaches sont élevées dans un bâtiment avec une aire de vie collective et des stalles individuelles équipées de matelas pour assurer le confort des vaches. Une brosse est à disposition des vaches dans leur aire de vie collective.

Pour entretenir leur aplomb, ces animaux sont régulièrement parés. Elles sont suivies par un vétérinaire. Elles sont nourries avec un régime composé de foin de luzerne, foin de Crau et d'un aliment composé.

13595 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au porc, les produits destinés à prévenir ou guérir les infections respiratoires permettent de limiter les conséquences d'une maladie et améliorent de façon notable le bien-être de l'animal et le rendement de l'éleveur. La preuve de concept d'efficacité de nouveaux traitements doit être évaluée dans l'espèce cible lors d'un épisode clinique.

L'objectif du projet est de mettre en place un modèle d'infection respiratoire chez le porc. Plusieurs études pourront être requises pour déterminer, pour chaque agent pathogène choisi, la dose infectante permettant d'avoir suffisamment d'animaux exprimant des signes cliniques et pouvant contaminer les cochons sains par contact direct entre les animaux. Ces études doivent être conduites dans l'espèce cible dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R, soit en limitant autant que possible le nombre d'animaux utilisés à chaque étude pour mettre en place et valider le modèle.

L'espèce cible est le porc jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la finalité de l'étude (vérification de la virulence du pathogène, choix de la dose infectante, infection en un ou deux temps...) dans le respect des textes réglementaires et lignes directrices correspondantes en vigueur et sera optimisé pour chaque nouvelle étude à partir des résultats précédents. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 500 animaux et la chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

Les études réalisées dans le cadre de ce projet seront conduites séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être autant que possible :

- tous les manipulations, traitements et prélèvements (sous anesthésie quand requis) seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU par du personnel compétent,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si nécessaire les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance excessive ; les conditions d'hébergement permettront aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques et comportementaux,

- les points limites seront, entre autres, toute altération inattendue du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, comme une léthargie et un isolement du groupe, perte de poids, hémoptysie, excrétion anormale dans les heures suivant l'infection ; toute observation laissant présager un mal-être autre que celui dû à l'infection respiratoire ou un mal-être dû à l'infection respiratoire trop important sera immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour le protéger.

Les animaux seront tous euthanasiés en fin d'étude et une nécropsie sera réalisée pour évaluer l'étendue des lésions pulmonaires et réaliser des prélèvements microbiologiques.

Ce projet couvre également :

- le recueil de tissus ou organes pour évaluer les lésions macroscopiques de l'infection,

- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques.

13596 La télomérase est une protéine qui joue des rôles fondamentaux dans la régulation de la prolifération des cellules. En effet, la télomérase permet de conserver la longueur des chromosomes et ainsi de contribuer à l'allongement de la vie des cellules. Ainsi, la télomérase est exprimée de façon anormale dans plus de 90% des cancers humains, toutes origines confondues. Outre la stabilisation des chromosomes, plusieurs études ont montré que la télomérase exerce d'autres

fonctions, qualifiées de non-canoniques, qui favoriseraient la progression tumorale. Ainsi, la télomérase contrôle des processus biologiques fondamentaux, normaux et pathologiques, tels que le développement de cancers. Cependant, les mécanismes régulant l'activité non-canonique de la télomérase restent méconnus. Comprendre ces mécanismes permettrait de développer des stratégies thérapeutiques innovantes visant à stopper la prolifération des cellules cancéreuses.

Dans ce projet, nous voulons déterminer si l'environnement immédiat des cancers influence la capacité de la télomérase à favoriser la progression tumorale *in vivo*. Aussi, ce projet permettra de déterminer si la modulation de l'environnement des cancers permet de limiter leur potentiel prolifératif. Pour ce faire, nous allons utiliser une lignée de souris génétiquement modifiées permettant d'induire la surexpression de la télomérase chez la souris adulte. Deux caractéristiques physiologiques observables sont associées à la surexpression maintenue de la télomérase chez la souris adulte :

1- La pousse accélérée des poils, suivi par leur perte. Ce phénotype n'a aucun impact sur le bien-être des animaux, et l'hébergement des animaux en groupes de 4 favorise le maintien de la température corporelle des souris malgré la diminution de la densité des poils.

2- La perturbation des cellules du rein associée à un dysfonctionnement de la filtration rénale qui apparaît au bout de 3 semaines de surexpression continue. Ce phénotype est réversible, et l'arrêt de la surexpression de la télomérase à ce stade aboutit à une récupération de la fonction de filtration du rein. Ainsi, afin de limiter l'impact de la surexpression de la télomérase sur l'état général des animaux, nous réaliserons des phases d'inductions courtes (2 semaines) et transitoires suivies par des périodes de récupération (Raffinement).

Afin de définir l'impact de la télomérase sur la progression tumorale *in vivo*, nous allons utiliser un protocole expérimental, utilisant des agents chimiques, permettant d'induire le développement d'un cancer cutané. Ce protocole est très reproductible et aboutit à l'apparition de lésions cutanées précédant le développement d'un cancer (papillomes cutanés) multiples (15 à 20 en moyenne par souris) en 10 à 20 semaines avec progression d'une partie restreinte de ces papillomes (1 en moyenne par souris) vers un carcinome à cellules squameuses en 20 à 50 semaines. Il est possible que la modulation de la télomérase dans ce contexte de cancer cutané induit provoque une accélération de la progression tumorale. Aussi, conformément à la réglementation éthique en vigueur qui impose de mettre en place les mesures permettant d'augmenter autant que possible le bien-être des animaux de laboratoire, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par la procédure expérimentale décrite dans ce projet grâce à l'utilisation d'une grille de score (Raffinement). Finalement, afin de déterminer l'impact de l'environnement du cancer sur la capacité de la télomérase à favoriser la progression tumorale *in vivo*, nous allons utiliser 2 groupes d'animaux : des animaux jeunes (3-6 mois) présentant un environnement constitué de protéines bien organisées conférant une bonne élasticité cutanée, et des animaux âgés (16-22 mois) présentant une diminution et une désorganisation des protéines de l'environnement, conférant une augmentation de la laxité de la peau.

D'autre part, en tenant compte des exigences de réduction, également imposées par la législation, nous avons choisi d'utiliser un nombre minimum de souris par groupe expérimental qui nous permet d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ainsi, pour réaliser ce projet sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 60 animaux.

Ce projet est mis en place sur la base de résultats montrant que la télomérase joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la survie de cellules cancéreuses *in vitro* (Remplacement). De plus, suite à ce projet, des analyses mécanistiques seront mises en place sur des cellules en culture *in vitro* (Remplacement). Cependant, l'étude de l'impact de l'environnement matriciel sur la capacité de la télomérase à promouvoir les étapes d'initiation et de progression tumorale associées à l'activation inappropriée du système immunitaire ne peut pas être réalisée sur des cellules en culture, et c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser cette expérimentation sur la souris.

13597 L'entérite nécrotique à *Clostridium perfringens* est une maladie préoccupante et très présente dans les élevages aviaires. C'est l'affection la plus sévère décrite parmi les entérites dues à des

clostridies. *C. perfringens* étant normalement présente dans l'environnement (sol, poussière, fientes et litière) et dans le tube digestif des poulets, la maladie se déclare notamment suite à un dysfonctionnement de la flore intestinale ou un dommage des muqueuses. Les facteurs déclenchants conduisant à l'implantation de la bactérie et à la génération de lésions sont encore mal connus.

L'objectif de ce projet est de mettre au point, d'optimiser et de valider un modèle expérimental de reproduction de l'entérite nécrotique à *C. perfringens* chez le poulet de chair. Ce modèle devrait permettre de disposer d'un outil pour tester des solutions alternatives aux antibiotiques employés aujourd'hui pour contrôler l'entérite nécrotique en élevage.

Pour mettre au point ce modèle, nous nous basons sur une expérience acquise antérieurement et sur la littérature scientifique sur le sujet. Notre choix porte ainsi sur la co-infection avec une coccidie (parasite intestinal unicellulaire) qui va favoriser l'implantation de la bactérie dans le tube digestif en détruisant des cellules de l'intestin pendant son cycle de développement.

En modifiant les doses de parasites et de bactéries inoculées, les délais entre l'inoculation des parasites et des bactéries, trois étapes sont envisagées :

- une première étape de mise au point pour obtenir les lésions caractéristiques souhaitées,
- une seconde étape d'optimisation en sélectionnant la modalité la plus concluante dans le premier essai et en affinant les paramètres, et enfin
- une troisième étape de validation et de confirmation de la reproductibilité du modèle.

Pour la mise au point du modèle, 180 poulets seront répartis dans 6 lots de 30 sujets, chaque lot ayant une modalité de co-infection coccidies-clostridies différente.

Pour l'étape d'optimisation, 120 poulets seront utilisés dans 6 lots de 20 sujets (effectifs diminués car suppression d'une date d'examen des lésions par rapport au premier essai).

Enfin, pour l'étape de validation, 60 sujets seront utilisés dans deux lots de 30 sujets. Au total, 360 animaux seront utilisés pour les trois étapes du projet.

Il n'existe actuellement pas de modèle sans passer par les animaux cibles de cette affection, à savoir les poulets.

Les différentes étapes ont été conçues pour utiliser un nombre d'animaux minimal mais suffisant pour s'affranchir des variations inter-individuelles et obtenir des résultats permettant de calculer des pourcentages de réussite.

Le modèle d'infection expérimentale est équipé des raffinements et d'enrichissement suivants : élevage en groupes homogènes, papier cartonné ondulé sur tout ou partie du plancher des cages pour soulager les aplombs, cordelettes suspendues, rampes d'abreuvement par pipettes qui servent également de perchoirs, éclairage naturel complété par un éclairage artificiel en jours courts.

13598 L'intestin est un organe essentiel pour l'homéostasie de l'individu. Il est recouvert d'une muqueuse recouvrant une surface de plus de 200m². Cette superficie en fait le tissu le plus grand de l'organisme. L'épithélium intestinal se compose de cellules hétérogènes dont les fonctions sont déterminées et spécifiques. Les cellules souches, au niveau des cryptes de Lieberkühn, sont capables de donner naissance à toutes les sous populations cellulaires épithéliales. L'épithélium a un fort taux de renouvellement. En effet, en 4-5 jours l'épithélium est totalement renouvelé. Un dérèglement de ce processus de différenciation est la source de nombreuses pathologies intestinales pouvant amener au développement de cancer. Il est donc un enjeu majeur de comprendre comment est régulé ce processus si dynamique. Par ailleurs, l'intestin est l'organe qui contient le plus grand nombre de cellules immunitaires. De nombreuses études indiquent un rôle majeur du système immunitaire dans la régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. En contrepartie, il s'avère que l'épithélium régule aussi l'homéostasie des cellules immunitaires sous-jacentes en leur alimentant en cytokines important pour leur homéostasie.

Aujourd'hui, l'objectif est de comprendre les mécanismes moléculaires du dialogue entre les cellules épithéliales intestinales et le système immunitaire. Pour disséquer le mécanisme de ce dialogue une analyse de l'impact de 3 molécules majeures potentiellement impliquées dans cette interaction

sera étudiée. Ainsi, pour y parvenir l'expression de ces 3 molécules spécifiquement et de façon conditionnelle sur les cellules épithéliales intestinales sera faite et une analyse grâce à des techniques multiparamétriques permettra de déterminer l'impact sur l'homéostasie du système immunitaire et des cellules épithéliales intestinales.

Seules des études chez la souris, pour qui les réactifs sont adaptés, et la caractérisation des différentes populations immunes de l'intestin bien décrite, permettent de répondre au rationnel du projet dans des conditions physiopathologiques adéquates.

Des expériences *in vitro*, comme des organoïdes d'intestin indique clairement un rôle de ces molécules sur la différenciation et l'activation des cellules épithéliales intestinales. Aujourd'hui, l'objectif est d'analyser ce rôle dans des expériences *in vivo* pour jauger de la relevance et de l'application de ces observations *in vivo*. En effet, le système d'organoïdes bien que pratique et informatif ne récapitule pas toutes les complexités d'interactions spatio-temporelles, moléculaires et cellulaires intervenant dans un organisme. Le modèle d'élimination d'expression spécifique sur les cellules épithéliales intestinales est un modèle établi, qui ne présente pas de risque majeur sur la santé et le bien-être de l'animal. Une étude pilote sur un petit nombre d'animaux sera établie pour pouvoir déterminer les études statistiques appropriées pour réduire au maximum l'effectif des animaux. Un contrôle journalier sera effectué pendant toute la durée de l'expérimentation pour s'assurer du bien être des animaux. Pour optimiser les données et réduire le nombre de souris, plusieurs personnes de l'équipe auront la charge de la récolte et de la préparation des tissus et des cellules pour les différentes expérimentations. Le nombre total de souris utilisés dans ce projet est de 287 pour 5 ans.

13599 Une perturbation de la balance entre neurones excitateurs et neurones inhibiteurs dans le cerveau est à l'origine de maladies neuro-développementales associées à un retard mental, mais aussi à l'apparition de maladies neurologiques telles que la schizophrénie et l'épilepsie.

Le gène étudié est impliqué dans la formation des neurones ainsi que dans la régulation de la balance entre excitation et inhibition. La perte de fonction de ce gène entraîne un syndrome de retard mental sévère associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie, des comportements autistiques et un déficit moteur.

Nous avons inactivé complètement ce gène dans les neurones inhibiteurs de souris afin de d'analyser de manière spécifique le rôle de ce gène dans ces neurones. N'ayant pas observés d'animaux avec les deux copies du gène inactivé au sevrage (appelés animaux "homozygotes"), nous avons analysé une portée à la naissance et une à 10 jours post-natal et déterminé si des animaux homozygotes étaient présents. Ainsi, nous avons pu trouver 1 individu homozygotes sur 7 à la naissance, mais aucun animal homozygote à l'âge de 10 jours, suggérant une létalité post-natale. Les animaux utilisés pour générer ces souriceaux homozygotes présentent une susceptibilité accrue aux crises épileptiques. Ce phénotype ne peut cependant pas être considéré comme dommageable pour la vie quotidienne de ces animaux qui se nourrissent normalement et ne présentent pas de signes de mal-être particulier.

Pour ce projet, nous voulons identifier la cause de la mortalité des souriceaux et analyser l'impact de l'inactivation du gène sur le développement post-natal des souris.

Afin de vérifier que nous avons bien le ratio attendu de 1/4 d'individus homozygotes à la naissance, nous récupérerons les animaux juste avant la naissance, au stade prénatal de 18,5 jours, ce qui permet de vérifier le nombre de souriceaux homozygotes présents ainsi que leur viabilité (respiration lors de la sortie de l'utérus). Nous utiliserons pour cette première procédure 40 animaux, ce qui est suffisant pour savoir si le ratio de 1/4 est respecté. Si nous obtenons au moins 1/10 de souriceaux homozygotes viables à E18,5, nous étudierons ensuite les fonctions vitales et motrices (mouvements respiratoires, mouvements moteurs spontanés, présence de spasmes...) de ces souriceaux à partir de la naissance et jusqu'au stade post-natal 10 (P10) (procédure 2). Nous utiliserons pour cette étude au maximum 80 animaux.

Nous utiliserons donc pour cette étude 120 animaux au maximum sur 5 ans.

Remplacement : le modèle animal est le seul qui nous permet d'étudier dans son ensemble les effets du gène d'intérêt sur les fonctions vitales ainsi que le développement moteur. De plus, la souris est le modèle le mieux adapté pour étudier l'impact sur un organisme de gènes associés à des maladies neuro-développementales.

Réduction : le nombre total d'animaux que nous utiliserons dépend du nombre d'animaux d'intérêt générés (animaux homozygotes). Si le nombre de souriceaux homozygotes viables trouvés à E18,5 est inférieur à 1/10, nous ne réaliserons pas l'étude post-natale.

Raffinement : La première procédure nécessite la sortie de fœtus de la mère et leur isolement, ce qui entraîne nécessairement un stress et une angoisse. Nous nous appliquerons à réduire ce stress au minimum en gardant les fœtus proches les uns des autres sur une plaque chauffante afin d'éviter une hypothermie et en limitant leur manipulation au strict nécessaire. Pour l'analyse post-natale, le suivi des animaux sera quotidien. Les souriceaux provenant d'une même portée seront gardés ensembles avec leur mère dans les cages de stabulation avec un carré de coton pour le nid. Ils ne seront isolés que durant de courtes durées, lors de l'examen et des tests. Nous suivrons leur état jour après jour des souriceaux dès leur naissance. Les points limites pris en compte sont des anomalies externes telles que des hématomes, saignements ou malformations, des difficultés à respirer et une perte de poids supérieure à 10%.

13600 La sénescence cellulaire est la réponse d'une cellule aux dommages qu'elle subit. La cellule cesse alors définitivement de croître pour éviter de devenir une cellule cancéreuse. De plus, les cellules sénescents sécrètent de nombreuses molécules de signalisation afin que les cellules voisines initient la réparation tissulaire. Ces molécules guident également le système immunitaire pour éliminer les cellules sénescents des tissus. Cependant, si les cellules sénescents ne sont pas supprimées à temps, les signaux puissants qu'elles libèrent peuvent avoir un impact négatif sur l'ensemble des tissus. L'accumulation de cellules sénescents est notamment le principal moteur du vieillissement et des maladies liées à l'âge, et une forte charge de cellules sénescents peut déclencher la formation de tumeurs et accélérer la croissance des tumeurs existantes.

Nous avons récemment découvert une nouvelle caractéristique des cellules sénescents, à savoir la fragmentation cellulaire, par laquelle les cellules sénescents cassent des fragments d'elles-mêmes. Nous avons observé ce phénomène lorsque la sénescence était causée par l'irradiation aux rayons X et aussi par l'activation oncogénique. De plus, nous l'avons détecté dans différents types de cellules humaines et de souris, ainsi que dans le foie de souris *in vivo*. Le rôle exact de ces fragments est inconnu, mais ils ont un potentiel certain pour transmettre des signaux importants aux cellules voisines.

Pour affiner notre protocole, nous avons d'abord étudié les effets directs des fragments sur les cellules en culture. En utilisant des cellules cancéreuses du foie, nous avons observé que le traitement répété avec des fragments fraîchement isolés induisait une croissance plus rapide des cellules. Cependant, pour comprendre complètement la fonction des fragments, nous devons étudier leurs effets sur les tissus d'un organisme vivant. Les tissus vivants sont complexes, composés de différents types de cellules et affectés par l'organisme entier, qu'il est impossible de modéliser en culture. De plus, les fragments sont susceptibles de stimuler le système immunitaire ; nous devons donc étudier les effets chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes.

L'injection intrahépatique guidée par ultrasons est un modèle idéal à cet effet. Dans ce modèle, des cellules ou des fragments sont injectés à un site spécifique dans le foie d'une souris anesthésiée et grâce à l'imagerie ultrasonore, aucune chirurgie n'est nécessaire. Nous allons d'abord étudier les effets des fragments induits par l'irradiation aux rayons X. A l'avenir, si nécessaire, nous utiliserons également les fragments provoqués par l'activation oncogénique.

Le but de ce projet est de caractériser les effets des fragments cellulaires sur les tissus hépatiques et de mesurer l'effet des fragments sur la croissance tumorale. Il s'agira d'injections uniques ou répétées de fragments à un site spécifique du foie que nous caractériserons par des analyses histologiques et moléculaires des tissus à différents temps. De plus, nous injecterons des cellules de carcinome hépatique (Huh7) avec ou sans les fragments dans le foie. L'effet des fragments sur

la croissance tumorale sera suivi de manière longitudinale par échographie. Cette approche nous aidera ainsi à réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons que les fragments auront un fort effet localisé dans les tissus et grâce à cela, nous ne nous attendons pas à des effets secondaires négatifs sur le bien-être de l'animal. Nous mesurerons la prolifération cellulaire, l'apoptose et la nécrose et nous évaluerons également l'activation des voies inflammatoires locales et l'infiltration des cellules immunitaires. À long terme, nous nous attendons à ce que les fragments affectent l'architecture des tissus et conduisent à la fibrose. De plus, nous prévoyons que les fragments accéléreront la croissance des cellules tumorales co-injectées et augmenteront potentiellement la probabilité de leurs métastases. Ces résultats seront d'une grande importance pour la compréhension d'un large éventail de maladies qui impliquent la sénescence cellulaire, comme l'athérosclérose, le diabète, le glaucome, la fibrose pulmonaire idiopathique, les maladies neurodégénératives et le cancer.

Remplacement : les effets directs des fragments ont été évalués au préalable *in vitro*, sur les cellules en culture. Cependant, pour comprendre complètement la fonction de ces fragments, nous devons étudier leurs effets sur les tissus d'un organisme vivant, composés de différents types de cellules, impossible de modéliser en culture.

Réduction : le suivi de la croissance tumorale après injection des fragments sera assuré par échographie, sur les mêmes animaux au cours du temps, réduisant ainsi l'effectif à utiliser. Un effectif de 8 souris par groupe sera utilisé pour évaluer l'effet de l'injection des fragments dans des souris immunocompétentes ou immunodéficientes. Un effectif de 12 souris par groupe sera utilisé dans les protocoles de co-injection avec des cellules tumorales. Ces effectifs, avec un total maximal de 344 souris au cours du projet, nous permettront d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et robustes.

Raffinement : le suivi par échographie est une technique non-invasive, qui ne requiert pas de chirurgie. Elle est pratiquée sous anesthésie gazeuse (à l'isoflurane). Les souris sont maintenues sur une plate-forme chauffante et les yeux sont hydratés avec de l'ocrygel tout au long de l'expérience et jusqu'à leur réveil, en surveillant la fréquence cardiaque et la respiration. Lors des injections réalisées sous échographie, la bétadine sera appliquée sur la peau pour la désinfecter et ainsi éviter ou minimiser tout risque d'infection. Nous n'attendons pas d'effets indésirables majeurs dans ce projet. Néanmoins, les animaux seront surveillés tous les jours. Ils disposeront de conditions d'hébergement optimales, avec accès à l'eau, à la boisson et à un enrichissement du milieu. Ils seront maintenus en groupe afin de conserver les interactions sociales, importantes pour cette espèce. Les sites d'injection seront surveillés afin d'éviter toute infection, qui, si cela se produisait, serait traitée avec les conseils de notre vétérinaire.

13601 Les jeunes animaux sont particulièrement sensibles aux infections gastro-intestinales et respiratoires. *Cryptosporidium* est un parasite qui affecte tous les mammifères jeunes ou immunodéprimés. Il est à ce jour la première cause des entérites diarrhéiques du veau ou chevreau nouveau-né.

Le but de ce projet est de pouvoir multiplier les souches de *Cryptosporidium* sur des veaux. Les jeunes bovins permettent d'obtenir un nombre de parasite suffisant pour réaliser des études *in vitro* et *in vivo* sans multiplier le nombre d'animaux utilisés. Il faut savoir que la multiplication des cryptosporidies est difficilement réalisable *in vitro* et ne permettrait pas d'obtenir de grandes quantités de parasites. De plus, la souche de parasite ne peut être congelée et doit être conservée à 4°C. La conservation des cryptosporidies à 4°C ne permet pas leur utilisation au-delà de 2 mois. C'est pourquoi, dans ce projet, un maximum de 9 veaux par an sera nécessaire, soit 45 pour la durée de la présente demande d'autorisation de projet.

Ces expérimentations seront réalisées en respectant la règle des 3R.

Remplacement : Pour obtenir suffisamment de parasites infectants, il n'y a à l'heure actuelle pas d'autres méthodes n'utilisant pas d'animaux.

Réduction : le nombre d'animaux est calculé à minima pour pouvoir conserver la souche au-delà de 2 mois.

Raffinement : Afin de limiter les effets de l'infection les animaux recevront préventivement un réhydratant ; l'hébergement sera enrichi par la présence de 2 poules de réforme, les animaux recevront au moins 3 visites quotidiennes.

13602 L'ostéosarcome (OsA) est la tumeur osseuse la plus fréquente chez les enfants et les adolescents. Pour mieux comprendre l'OsA et donc mieux le traiter, il est nécessaire de développer des modèles récapitulant les interactions entre les cellules tumorales et l'environnement osseux et en prenant en compte l'âge de survenue de la tumeur. Si des modèles cellulaires de l'OsA existent-ils ne reproduisent pas ces interactions. Pour mieux connaître la biologie de cette tumeur et ses interactions avec son environnement complexe, des modèles animaux sont nécessaires. Des modèles d'OsA existent, cependant ils sont établis en position sous-cutanée et/ou chez des animaux dépourvus de système immunitaire. Il ne récapitule donc pas les caractéristiques environnementales (l'os), ni l'immaturité du système immunitaire de l'enfant.

Des études sur échantillons issus de patients et bioinformatiques ont montré l'importance des cellules immunitaires et de l'environnement osseux dans la progression et réponse aux traitements de cette tumeur. Des expériences ont confirmé que la réponse à un traitement variait si les modèles d'ostéosarcome étaient établis en position sous cutanée ou intraosseuse et avaient un système immunitaire incomplet. Ces constatations indiquent que pour mieux comprendre l'ostéosarcome il faut développer un modèle tumoral reproduisant ces caractéristiques essentielles. Le recours au modèle animal est maintenant indispensable.

Il existe un modèle d'OsA greffable de rat développé contre l'os chez des animaux, âgés de 4 semaines et ayant un système immunitaire complet (ou immunocompétents). Le but de ce projet serait de transformer ce modèle qui reproduit l'OsA survenant chez les jeunes adultes (>15 ans) en modèle en position réelle (dans le tibia) chez des animaux immunocompétents âgés de 2 semaines afin de reproduire l'environnement osseux et immunitaire de l'OsA pédiatrique. Ce modèle sera caractérisé en terme de progression, histologie, signature moléculaire et réponse à une chimiothérapie conventionnelle. En intégrant les caractéristiques liées à l'environnement osseux, et au système immunitaire complet et immature, ce modèle fournirait un outil plus adapté pour mieux comprendre la biologie de l'OsA et pour tester dans des conditions plus proches de la réalité clinique de nouvelles thérapies.

L'établissement d'un nouveau modèle se fera en quatre procédures successives. Une première procédure permettra de générer un stock de suspensions cellulaires congelées. Ces cellules seront injectées dans le tibia des animaux au cours des procédures suivantes. Après avoir déterminé la quantité de cellules optimale pour obtenir le modèle intra-osseux, celui-ci sera caractérisé en terme de progression, morphologie, expression de gènes d'intérêt, description des cellules de l'immunité présentes, réponse tumorale à un traitement conventionnel.

Au terme de ce projet un nouveau modèle d'Osa sera établi. Celui-ci pour la première fois prendra en compte les caractéristiques essentielles de l'OsA : ses interactions avec l'environnement osseux et immunitaire immature puisque la tumeur sera obtenue chez des animaux jeunes (2 semaines lors de l'implantation).

Tout au court de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal.

Pour réduire au maximum la douleur induite à l'animal au cours de toutes les opérations, un antidouleur sera administré à l'animal avant la chirurgie réalisée sous anesthésie générale. Afin d'éviter tout possible rejet des petits par leur mère, lors de la chirurgie, et avant leur réveil et retour dans leur cage, les petits seront frottés dans la litière sale contenant leur odeur.

L'état général et le comportement des animaux seront observés quotidiennement, la taille des tumeurs sera mesurée 2 fois par semaine, un examen clinique des animaux sera réalié à ce moment. Nous observerons tout signe de douleur relatif à la progression tumorale. En cas de signes de douleurs chez l'animal, une injection d'antidouleur sera effectuée.

Dans ce projet, un nombre maximum de 118 rats seront utilisés, répartis dans 4 procédures expérimentales. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum mais dans des mesures satisfaisantes pour pouvoir établir, valider et conserver le modèle. L'administration d'anesthésique

et d'antidouleur, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

13603 Le syndrome du côlon irritable (IBS) concerne 10% de la population mondiale, le plus souvent des femmes de 20 à 40 ans. Les symptômes peuvent apparaître dès l'enfance, et dans 10% des cas les syndromes apparaissent à la suite d'une gastro-entérite.

Les symptômes de l'IBS les plus fréquents sont des douleurs abdominales, des crampes, des ballonnements, des diarrhées et ou de la constipation, du mucus...

Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant d'étudier la douleur viscérale dans son intégralité n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la douleur colorectale induite par une distension rectale après sensibilisation avec un agent inflammatoire chez des rats. Cet agent sera administré une seule fois par voie intra-colique sous anesthésie générale et sept jours après la douleur sera évaluée en réponse à une distension colorectale.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 750 rats, sur 5 ans, à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE à savoir 2 à 4 rats par cage d'hébergement et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. L'état des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel compétent afin de s'assurer de leur bien-être et de l'absence de point limite à savoir prostration, perte de poids, présence de crampes abdominale, présence de blessure, Après chaque intervention chirurgicale, une attention particulière sera apportée sur le réveil des animaux et l'absence d'agressivité vis-à-vis de ces congénères.

Si un animal présentait un point limite, il serait isolé et hydraté et mis en présence de nourriture dans la litière. Si son état ne s'améliorait pas dans les 48h, les expérimentateurs compétents excluraient l'animal de l'étude et l'euthanasieraient.

Ce projet comportera des procédures classées sévères, il nécessitera de ce fait une évaluation rétrospective.

13604 L'immunothérapie consiste à stimuler la réponse immunitaire des individus pour lui permettre de lutter contre les cellules cancéreuses. Elle constitue une avancée majeure dans le traitement du cancer mais les taux de réponses restent bas (10 à 57% selon les types de cancers et les traitements utilisés). Une protéine appelée interféron gamma (IFN γ) joue un rôle clef dans la réponse à l'immunothérapie. Nous avons conçu un traitement appelé DMBP5 capable de stimuler la production d'IFN γ par les cellules tumorales et donc d'améliorer l'efficacité des immunothérapies. Le traitement par DMBP5 dans des cellules de mélanome ou de cancers coliques ou pulmonaires entraîne la production par ces cellules d'IFN γ et attire et active les cellules immunitaires au sein des tumeurs. DMBP5, utilisé seul, réduit la taille des tumeurs sous-cutanées sans entraîner de toxicité chez la souris. Lorsqu'il est associé à un traitement par immunothérapie, il induit une diminution majeure de la taille des tumeurs avec une régression complète dans plusieurs cas.

Nous avons développé des composés dérivés de DMBP5 afin d'améliorer son efficacité et augmenter sa pénétration dans les tumeurs. Afin d'avoir une approche plus physiologique et envisager ensuite ces traitements chez l'Homme, nous aimerions tester ces différentes molécules seules ou en association avec une immunothérapie sur des modèles de souris. Nous injecterons des cellules tumorales en sous-cutané pour évaluer l'effet des molécules sur la croissance des tumeurs de mélanome dans des souris possédant un système immunitaire complet. Nous utiliserons également des souris ayant un système immunitaire amoindri afin d'évaluer l'impact de

nos molécules sur les cellules cancéreuses en l'absence de système immunitaire compétent. Après injection sous-cutané des tumeurs se développent systématiquement. Le traitement est débuté dès que les tumeurs sont mesurables (en général après 3 à 5 jours). Les souris sont sacrifiées lorsque la taille de la tumeur atteint 1cm³ (en général 2 à 3 semaines en l'absence de traitement). Par ailleurs le protocole d'expérimentation a été soigneusement planifié. Le suivi est fait par des méthodes non invasives (mesure des tumeurs sous cutanées). Enfin des points limites devant conduire à l'euthanasie ont été définis. Ainsi, si les animaux ont une perte de poids (cassure de la courbe de croissance), un changement de comportement (souris isolée, agitée), ou toute modification physique pouvant entraîner une souffrance, l'animal sera euthanasié avant la fin de l'expérimentation. Conformément à la réglementation éthique en vigueur qui impose aux chercheurs de remplacer, des études *in vitro* sont réalisées pour définir les concentrations optimales d'utilisation des différents composés avant de les utiliser chez la souris. Afin d'optimiser l'expérimentation (raffinement) ces modèles murins ont été choisis car ils sont le plus à même de pouvoir répondre sur l'efficacité des traitements évalués. Ces modèles permettront d'évaluer l'efficacité de ces produits dans le traitement du mélanome et d'autres cancers solides et serviront de base à une étude chez l'Homme. Nous espérons voir une régression des tumeurs et un allongement de la survie chez les souris traitées. Enfin, dans un souci de réduction, nous utiliserons le nombre d'animaux le plus restreint permettant l'analyse statistiques des résultats. Les demandeurs sont titulaires d'une formation à l'expérimentation animale, et les animaux seront observés quotidiennement afin de prendre en charge, précocement, tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort. Les souris évoluent dans un milieu enrichi avec des igloos les isolant de la lumière, des tiges en papier et sont hébergées à 5 souris par cage de 500 cm². Nous utiliserons un total de 930 souris dans ce projet.

13605 Le but de ce projet est de déterminer l'effet thérapeutique de molécules dans le traitement des dyslipidémies ou troubles de stockages des lipides, dans un modèle de souris alimenté avec une diète de maintenance enrichie en cholestérol.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, dont l'impact de la suppression d'un gène a été étudiée au préalable, en démontrant les troubles lipidiques. En particulier, ces souris présentent une accumulation de cholestérol dans le sang et développent des plaques d'athérome, permettant ainsi d'utiliser ce modèle pour comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose en clinique humaine, et d'évaluer des molécules thérapeutiques.

Nous évaluerons dans le cadre de ce projet l'effet protecteur de molécules-candidates, qui vont empêcher le développement de la pathologie. Nous suivrons en particulier le taux des lipides sanguins et la composition corporelle en masse grasseuse et masse maigre avant et après traitement, ainsi le développement de plaques d'athérome au niveau de l'aorte. Nous comparerons des souris traitées avec les différentes molécules à des souris ne recevant que le véhicule (placebo). Les composés seront administrés par différentes voies (gavage oral, injection sous-cutanée, ou injection intraveineuse), durant 4 semaines, à une dose et une fréquence déterminée au préalable, en s'assurant de l'absence de toxicité des produits.

REMPACEMENT: Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude de molécules sur un gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène induisant la pathologie sont traitées par différents molécules-candidates et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles non traités. Des lots de 12 animaux par traitement seront utilisés afin de pouvoir obtenir des résultats valides.

Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser l'efficacité des molécules pour corriger les troubles lipidiques.

REDUCTION: Tous les tests utilisés font partie des tests classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette série de tests permet de mettre en place un corpus

de données visant à déterminer l'impact du traitement sous un régime standard de maintenance enrichi en cholestérol.

Du fait de l'utilisation de tests standardisés successivement appliqués sur les mêmes animaux expérimentaux avant et après traitement, nous réduisons le nombre d'animaux utilisés.

Nous avons par ailleurs effectué des analyses statistiques permettant de n'utiliser que le nombre d'animaux nécessaire dans chaque test, tout en permettant d'obtenir des résultats fiables.

Par ailleurs, un groupe contrôle, non traité, sera mutualisé pour l'évaluation de 2 composés afin de réduire le nombre d'animaux.

Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction. Ainsi 12 souris seront utilisées par traitement, l'objectif étant d'évaluer 6 molécules (soit un total de 108 animaux, 6 lots traités + 3 lots non traités)

RAFFINEMENT:

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état de santé des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Pour les procédures impliquant des injections, les sites d'injections seront désinfectés après injection et particulièrement surveillés lors du suivi quotidien des animaux. Un enrichissement sera mis dans chaque cage d'hébergement. Les souris utilisées sont issues d'une lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun phénotype létal ou majeur n'a été observé.

13606 L'exposition des valves cardiaques à la sérotonine (5HT), secrétée par certaines tumeurs du foie, est à l'origine de la survenue d'une atteinte cardiaque dite carcinoïde. Il s'agit d'une maladie associée à un taux de mortalité élevé chez l'homme. La 5HT produite par la tumeur va entraîner des modifications majeures de la structure des valves cardiaques. A ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique efficace pour traiter cette atteinte carcinoïde cardiaque, et le seul traitement est le remplacement de la valve lors d'une chirurgie cardiaque. La création d'un modèle expérimental de souris ayant une atteinte cardiaque carcinoïde, non développé à ce jour, permettra d'évaluer l'efficacité de traitements pharmacologiques, avant de les tester chez l'homme.

Une demande APAFiS, acceptée par le comité d'éthique local, a déjà été effectuée pour la création du modèle murin de cardiopathie carcinoïde, ayant permis de faire des expériences préliminaires. Des tumeurs ont été implantées au niveau du foie des souris révélant une bonne tolérance des animaux mais une mortalité précoce du fait du caractère trop agressif de la tumeur.

La présente demande porte sur la partie imagerie du projet qui utilisera une tumeur moins agressive.

Objectifs: Evaluation de la dissémination tumorale par un acte d'imagerie et évaluation des modifications de structure des valves cardiaques par échographie.

La règle des 3R sera respectée.

La valvulopathie carcinoïde est un processus complexe faisant intervenir plusieurs organes et types cellulaires, et l'étude de l'impact sur les valves de la production excessive de 5HT ne peut donc se faire que sur des organismes vivants, comme les souris, et ne permet pas le remplacement par des études *in vitro*. Nous développons en parallèle une approche expérimentale basée sur l'analyse d'échantillons prélevés chez l'homme. Cette approche est néanmoins observationnelle et ne permettra pas de répondre à la question de l'efficacité de traitements pharmacologiques sur le traitement de la valvulopathie carcinoïde. Ainsi, ce projet s'inscrit dans une perspective de développement clinique chez l'homme, et il est donc indispensable d'avoir des données préliminaires avec un modèle animal.

Pour cette étude nous utiliserons 144 souris (72 mâles et 72 femelles). Ce nombre minimal a été établi au regard des résultats préliminaires obtenus dans le cadre d'une demande APAFiS précédente acceptée et permettant de réaliser avec un nombre minimal de souris les investigations requises.

Afin de respecter le principe de raffinement, les animaux seront observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie et tout comportement anormal sera directement communiqué à la personne responsable du projet. De plus, les animaux seront observés quotidiennement par les

expérimentateurs qualifiés et connaissant bien cette espèce animale. Enfin, les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement. Tous les examens d'imagerie seront réalisés sous anesthésie, et les souris seront placées sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil. Les examens d'imagerie seront réalisés à 3,6 et 9 semaines du début du projet sous anesthésie. L'apparition des points limites sera surveillée, et en cas d'apparition de ces derniers les animaux seront euthanasiés. Les animaux seront sacrifiés au bout de 9 semaines.

Une durée de 3 ans est prévue pour cette étude.

13607 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique qui touche 1 % de la population après 65 ans. On compte environ 100 000 malades en France, et 8 000 nouveaux cas se déclarent chaque année, un nombre qui est en augmentation constante. Cette maladie touche, entre autres, les neurones dopaminergiques dans une région du cerveau profonde appelée "substance noire" qui dégénère progressivement. Ces neurones produisent la dopamine, un neurotransmetteur qui contrôle les mouvements automatiques du corps. L'objectif de nos études est de comprendre l'action d'un composant particulier de notre génome, les séquences répétitive, qui sont mobiles et peuvent se multiplier dans le génome des mammifères. Suite à cette mobilité, ces éléments et leur fragments fossilisés représentent presque la moitié du génome humain et souris. Des études récentes, dont une étude de notre laboratoire, suggère que le vieillissement des neurones pourrait favoriser l'activité de ces éléments qui, par eux-même et due à leur machinerie de mobilisation, pourrions contribuer à la neurodégénérescence. Nous étudions donc au laboratoire ces éléments mobiles dans le contexte de la physiologie et la physiopathologie des neurones dopaminergiques. Le modèle utilisé, en dehors des modèles de cultures cellulaires de neurones primaires, sera la souris *mus musculus*. La souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse *in vivo* de ces mécanismes et les conséquences de leurs perturbations par des manipulations génétiques et cela à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elles permettent aussi de créer des modèles d'étude des pathologies humaines. Nous utilisons des modèles de la maladie chez la souris pour a) comprendre l'action de ces éléments mobiles, b) comprendre les voies de signalisation impliquées et ses cibles et c) tester des interventions pour pouvoir réguler leur activité. Nous remplaçons, dès que possible, les études sur les souris vivantes par des études sur des cellules en culture. Nous avons mis au point des techniques permettant de réduire par deux le nombre d'animaux nécessaire et nous optons pour des méthodes très sensibles qui permettent de faire plusieurs analyses à partir d'un seul prélèvement. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Nous avons estimé, avec l'aide de programmes statistiques, le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement exploitables. Nous comptons utiliser au total 1098 souris.

Notre but est de comprendre le rôle des éléments mobiles dans la physiologie et pathophysiologie des neurones adultes et de trouver des approches de régulation de ces éléments dans l'optique d'intervention thérapeutiques dans des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.

13608 L'apprentissage de la chirurgie pour les futurs médecins se fait d'abord sur pièces anatomiques puis par parrainage progressif au bloc. Cependant, ce parrainage a ses limites notamment pour l'enseignement à de nouvelles pratiques ou à la manipulation de nouveaux matériels. La coelochirurgie ou chirurgie par endoscopie est une technique en constante évolution et elle demande un training conséquent avant de maîtriser correctement l'abord et la gestuelle. Une partie de cet apprentissage se fait *ex vivo* dans des boîtes appelées « coelio trainer » notamment pour la manipulation des outils (pinces, ciseaux, coagulateurs etc...) et leur contrôle sur écran.

Les cours théoriques puis l'entraînement sur l'animal sont destinés à diminuer la courbe d'apprentissage nécessaire à chaque intervention de coelochirurgie. Les indications reconnues pour les différentes disciplines sont exposées. De même l'introduction des trocars, la création du pneumopéritoine (insufflation de dioxyde de carbone dans la cavité abdominale pour mieux

visualiser les organes et les isoler de la paroi), l'exposition c'est-à-dire la manipulation correcte des organes, la qualité de l'image, la gestuelle sont détaillés pour éviter les accidents dus au non respect des principes de base. La pratique chirurgicale correcte (respect des tissus, contrôle de l'hémostase, techniques de suture etc) nécessite absolument un entraînement *in vivo* : les pièces anatomiques ne suffisent pas à enseigner la tension des tissus et organes, la fragilité vasculaire ou des parois. Le passage sur organisme vivant est indispensable et il est souhaitable que cet entraînement soit effectif avant la présence en bloc hospitalier, ce qui justifie cette phase préliminaire sur animal.

L'enseignement par simulation s'est imposé ces dernières années pour plusieurs raisons :

§ La complexité des nouvelles techniques plus difficiles à enseigner sur le site opératoire (coelioscopie, robotique) du fait de la perte de contact direct et de la nécessité d'une bonne coordination oeil-main

§ Le développement de la chirurgie ambulatoire nécessitant des interventions rapides et « parfaites

§ Le problème de la sécurité du patient mis en avant

§ La surcharge de travail lié à la nécessité d'augmenter l'activité (T2A) et donc moins de temps pour aider les chirurgiens en formation

§ La dépendance du flux de patient pour certaines interventions

§ La diminution du temps de travail (48h, repos de sécurité, la journée de formation)

L'ensemble de ces constatations a conduit la Haute Autorité de Santé dans un rapport précisant la place de la simulation en santé à proposer comme objectif éthique prioritaire l'item : « jamais la première fois sur le patient ». L'ensemble des enseignants de chirurgie viscérale et digestive a donc décidé de développer, sous l'égide du Collège et des deux CNU, un programme de formation pratique national, structuré, uniformisé et standardisé basé sur la simulation et comportant les objectifs à enseigner, les moyens humains et matériels nécessaires pour chaque objectif et enfin les grilles d'évaluation pour chaque objectif. Ainsi cette enseignement va permettre aux étudiants de compléter tous les objectifs d'apprentissage des différentes procédures chirurgicales.

Pour réduire le nombre d'animaux, les stagiaires travaillent par groupe de deux ou trois pour un même animal. L'espèce choisie est le porc de par ses similarités anatomiques et physiologiques avec l'Homme. L'animal est endormi environ 8 heures : un côté est opéré le matin puis l'animal est retourné pour permettre une deuxième intervention sur l'autre côté.

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux (même portée élevée ensemble), dans des cases chauffées et sur paille pour que les animaux puissent fouir et jouer (enrichissement du milieu). Le matin de l'intervention, les animaux sont anesthésiés, l'anesthésie générale étant maintenue toute la journée. Il n'y a pas de réveil des animaux, l'euthanasie par surdosage barbiturique se déroule sous anesthésie. Les animaux ne sont pas réveillés car les chirurgies réalisées en entraînement impliquent des exérèses d'organes vitaux (reins par exemple).

Le nombre total d'animaux par an est de 72 porcs LW (18 porcs par semaine, sur deux journées pratiques réparties sur 4 semaines) soit 360 porcs sur 5 ans.

13609 Notre équipe étudie les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perception douloureuse, et en particulier le rôle de protéines membranaires exprimées par les neurones sensoriels, les canaux ioniques, en développant leur pharmacologie. A partir d'une bibliothèque de venins animaux, nous avons déjà identifié plusieurs peptides (d'anémone de mer, de mygale et de serpents) à l'origine de 3 brevets pour proposer ces toxines animales comme nouveaux analgésiques potentiels alternatifs à l'usage de la morphine. Grâce à de nombreuses résultats obtenus sur des cellules en culture et chez l'animal, qui ont donné lieu à des publications de haut niveau scientifique, des canaux ioniques que nous avons étudiés sont maintenant connus pour participer à la détection de la douleur par les terminaisons nerveuses sensorielles périphériques, par exemple au niveau de la peau, des muscles ou des organes, et sont identifiés comme de nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt.

Dans le cadre d'un projet collaboratif, certains peptides naturels que nous avons découverts sont maintenant modifiés chimiquement pour optimiser leur potentiel thérapeutique (meilleure stabilité *in vivo*, plus faible dose active, suppression de la réponse immunitaire associée, peptide de taille réduite etc....) afin de pouvoir les proposer à un prochain développement clinique. Pour cela, les propriétés et les effets des peptides modifiés sont d'abord testés *in vitro* sur des canaux ioniques exprimés dans des cellules en cultures, mais doivent ensuite être testés *in vivo* et comparés avec ceux des peptides naturels de référence. C'est le but de ce projet.

Pour cela, nous allons comparer les effets anti-douleur de chaque peptide modifié avec les effets du peptide naturel, dans une gamme de modèles de douleur chez les rongeurs (rats et souris) pour mettre en évidence les différences d'activité. Différentes voies d'injection seront testées: la voie intra-veineuse (i. v.) et la voie locale sous-cutanée (s. c.) dans une patte arrière. Le test de quatre peptides dérivés est prévu au cours des cinq années de ce projet, dont deux sont déjà synthétisés. La spécificité des effets des peptides modifiés *in vivo* sur les canaux cibles sera testée sur des souris génétiquement modifiées où les gènes des canaux-cibles ont été invalidés, ainsi qu'en testant d'éventuels effets indésirables des peptides non pas sur la douleur mais sur la motricité.

L'objectif de Réduction a été pris en compte en réduisant le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre d'animaux total (1890 souris et 90 rats pour 5 ans) annoncé ici correspond au nombre maximal nécessaire. Il sera réduit chaque fois que possible, et toute expérience rendue inutile par des résultats précédents obtenus par nous ou d'autres groupes (veille bibliographique mondiale permanente) ne sera pas conduite. Dans le cadre de l'objectif de Raffinement, la longue expérience de notre groupe dans les études des mécanismes de la douleur chez l'animal nous permet de proposer des tests comportementaux complémentaires mettant en jeu différentes modalités douloureuses (thermique chimique ou mécanique, aiguë ou inflammatoire...) ou motrices (motricité intégrée ou force musculaire) avec une sévérité légère à modérée. Le maximum d'expériences préliminaires a été réalisé sur des lignées cellulaires, puis sur des neurones de rongeurs en culture, mais aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance: ces études précliniques chez l'animal, qui permettent seule l'étude de la réalité physiologique dans un contexte intégré, restent nécessaires à la poursuite d'études cliniques pour développer de nouveaux analgésiques.

Dans le cadre de la prise en compte de leur souffrance, les animaux seront habitués aux tests préalablement afin de réduire leur stress. Nous ne pouvons pas néanmoins envisager l'emploi d'analgésique ou d'anesthésique dans nos procédures qui ont pour objet d'étude la douleur. Les animaux sont euthanasiés dès la fin de l'expérience qui se déroule généralement sur la journée. Grâce à un suivi quotidien de chaque animal tout au long de chaque procédure, tout animal qui présenterait des signes de paralysie, de douleur excessive permanente (vocalisations, convulsions), de comportement basal anormal (prostration, apathie) ou d'une pathologie quelconque (plaie) serait euthanasié sur le champ.

13610 Les déficits dans le traitement et le comportement sensoriel sont associés aux maladies neurologiques et neuropsychiatriques humaines incluant Alzheimer, crises d'angoisse et dépressions. Une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de traitements sensoriels pourrait donc conduire à une nouvelle approche thérapeutique, plus performante pour l'homme. Comment l'information est-elle traitée dans le cerveau et comment contrôle-t-elle le comportement ? Ce sont des mécanismes beaucoup trop complexes qui ne peuvent être étudiés par de simples systèmes de cultures. Pour répondre à ces questions, il faut un cerveau complet d'un organisme modèle tel que la souris. [SEP]

Nous utilisons le système olfactif des souris comme modèle, car les souris sont génétiquement très connues et assez proche de l'homme et chez qui l'odorat est le sens privilégié. Nous utiliserons des conditionnements olfactifs (apprentissage de comportements récompensés et apprentissage percepteur) pour mieux comprendre comment les neurones s'adaptent et contrôlent le comportement olfactif. Pour cela, nous allons changer le niveau d'expression de certaines protéines dans le cerveau de souris par injection précise de molécules et par la suite faire des tests de

comportement. Ensuite, après euthanasie réglementaire, les cerveaux seront prélevés pour des analyses histologiques et biochimiques.

Pour toutes nos expériences, les souris sont anesthésiées selon les normes éthiques en vigueur. Toute souris ayant subi une expérience sous anesthésie est ensuite placée dans des conditions enrichies pour son bien-être. Les conditions expérimentales ont été optimisées au mieux afin de minimiser le nombre d'animaux, qui sera au maximum 186.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les souris sont hébergées dans une animalerie récemment rénovée. Elles sont sous contrôle de la température et de la lumière (en cycle jour/nuit). Elles bénéficient de l'équipement complet pour leur bien-être (cotons pour leur nid, nourriture et eau libre d'accès, nourriture plus riche si besoin). Les visites pour veiller à leur bien-être sont journalières.

13611 Le mélanome est un cancer de la peau très agressif dont l'incidence est toujours en augmentation en France. La moitié des patients atteints de mélanomes métastatiques sont en échec thérapeutique et nécessitent de nouveaux traitements. Les premières métastases apparaissent en général dans le ganglion lymphatique avant de se disséminer vers les organes vitaux. Le ganglion sain est un tissu immunitaire qui n'est normalement pas propice au développement tumoral. Notre projet consiste à mieux comprendre (1) comment les facteurs sécrétés par le mélanome cutané modifient à distance le ganglion pour en faire un environnement favorable au développement métastatique du mélanome, et (2) comment le microenvironnement du ganglion influence la capacité du mélanome à métastaser dans les organes secondaires. Dans ce but, nous voulons caractériser les modifications des cellules immunitaires et des fibroblastes dans des ganglions reprogrammés par les facteurs sécrétés par mélanome et étudier le potentiel métastatique dans le poumon de cellules de mélanome adaptées au microenvironnement ganglionnaire. A terme, notre projet vise à identifier des marqueurs métastatiques précoces et de nouvelles cibles thérapeutiques susceptibles de cibler le dialogue entre les cellules tumorales et le microenvironnement de la niche ganglionnaire pour détecter et éviter les rechutes des patients.

Le processus métastatique complexe que nous étudions implique une communication entre plusieurs organes (peau, ganglion et poumon). Résoudre cette question *in vitro* n'est pas possible et le recours à un modèle animal est indispensable. Dans un effort de Remplacement (règle des 3R), nous avons au préalable utilisé des cellules humaines *in vitro* pour valider le concept de reprogrammation des fibroblastes du ganglion par les facteurs sécrétés par le mélanome, ainsi que la modification de l'activation des lymphocytes T au contact de fibroblastes ganglionnaires sains ou reprogrammés par le mélanome. Ces résultats prometteurs nécessitent aujourd'hui d'être validés *in vivo*. Nous avons utilisé le logiciel d'analyse statistique G. Power pour Réduire au maximum le nombre minimum d'animaux nécessaires (351 souris au total) sans compromettre les objectifs du projet, en utilisant notamment le ganglion contra-latéral de chaque souris comme contrôle pour éviter d'utiliser un lot supplémentaire de souris contrôles dans chaque expérience. Nous utiliserons des souris C57Bl/6 sauvages et des souris génétiquement modifiées de phénotype non dommageable (souris pCol-GFP, OTI et OTII). Dans nos procédures expérimentales, la douleur des animaux sera limitée à des injections intradermique, intra-péritonéale ou intraveineuse. Dans un souci de Raffinement, les métastases ganglionnaire ou pulmonaire seront strictement limitées à un stade précoce grâce au suivi par des techniques d'imagerie non invasives (Photon Imager).

De plus, le bien-être des souris sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'enrichissement de l'hébergement (présence de tige en coton pour la nidification et d'igloo dans les cages), de surveillance et de soins afin de réduire au maximum le stress ou la douleur que pourraient ressentir les animaux.

13612 Les vésicules extracellulaires (VEs) constituent un mode de communication intercellulaire très efficace du fait des biomolécules (protéines, acides nucléiques, microARN...) qu'elles véhiculent. Les VEs (exosomes, microvésicules, vésicules apoptotiques) sont produites par la plupart des

cellules eucaryotes et leur libération est souvent exacerbée lors de pathologies, notamment lors du développement de cancers.

Le virus de la maladie de Marek (MDV) est un herpesvirus responsable du développement rapide de lymphomes T chez son hôte naturel, le poulet. Une étude récemment menée dans notre laboratoire a permis de caractériser les VEs émises *in vitro* dans des surnageants de culture de fibroblastes infectés par le MDV et de lymphocytes T transformés MDV. L'analyse du contenu des VEs émises par ces deux types cellulaires spécifiques a révélé qu'elles ne comportaient pas de protéines virales mais de nombreuses protéines cellulaires susceptibles de réguler de grands processus physiologiques tels que la réponse immune, l'inflammation, les voies métaboliques cellulaires et la prolifération des cellules. Nous avons également montré que les vésicules libérées par les cellules lymphomateuses MDV sont capables d'être internalisées par des cellules receveuses et de moduler la prolifération de lymphocytes primaires de poulet.

Dans la continuité de cette étude menée *in vitro*, nous souhaitons caractériser les VEs libérées au cours des différentes phases de l'infection MDV (phase cytotytique précoce, phase de latence/établissement de la tumorigenèse et phase de lymphomagenèse) chez le poulet. En effet, à l'échelle de l'organisme, les VEs sont produites simultanément par une multitude de cellules de types différents. Dans l'organisme, elles peuvent avoir une activité localisée sur les cellules se trouvant à proximité de celles dont elles sont issues, mais elles sont également retrouvées dans tous les fluides biologiques dont le sang et peuvent ainsi avoir une action à distance. Cette étude nous permettra donc de considérer l'impact des VEs dans leur ensemble et non plus associé à un type cellulaire donné. Ce projet sera basé sur une étude comparative entre 2 virus : une souche virale oncogène et une souche avirulente, souche vaccinale classiquement utilisée en médecine vétérinaire qui protège les animaux contre le développement des tumeurs MDV. L'étude comprendra 2 phases d'expérimentation animale nécessitant chacune 30 poulets soit 60 poulets au total.

In fine, cette étude nous permettra (1) d'établir si la composition des VEs évolue au cours des phases de l'infection MDV et si elle varie selon la virulence de la souche virale utilisée ; (2) d'identifier des protéines/microARN enrichis dans les VEs et qui pourraient constituer de nouveaux biomarqueurs sanguins pronostiques du développement de lymphomes et (3) de préciser si les molécules contenues dans les VEs libérées pendant les différentes phases de l'infection peuvent induire des signaux influant sur l'établissement et la progression de la lymphomagenèse.

L'expérimentation animale conduite dans le cadre de ce projet sera réalisée conformément à la directive européenne 2010/63/UE et dans le respect du principe des 3R :

-Remplacement : Nous avons déterminé *in vitro* que les VEs produites par 2 types cellulaires spécifiques (fibroblastes infectés et lymphocytes T transformés par le MDV) influaient significativement sur la prolifération/activation des lymphocytes primaires. Il faut noter que les fibroblastes constituent à l'heure actuelle le système le plus efficace pour répliquer le MDV *in vitro*, cependant ces cellules ne sont pas la cible préférentielle du MDV. Aussi, l'utilisation de modèles cellulaires pertinents *in vitro* (lymphocytes, kératinocytes) pour poursuivre l'étude du rôle des VEs au cours de l'infection MDV n'est pas envisageable au vu des faibles taux d'infection obtenus en culture et de la forte mortalité des cellules primaires survenant rapidement post-isolément. De plus, notre étude est basée sur la diversité des VEs produites par les différents types cellulaires constituant le poulet (et non sur un type cellulaire donné). Par conséquent, il paraît essentiel de poursuivre ces études dans un modèle d'infection naturelle chez l'animal.

-Réduction : Des tests préliminaires nous ont permis de définir le volume de sang minimum nécessaire pour collecter la quantité de vésicules requise pour nos analyses ultérieures. Ainsi, nous avons sélectionné des poulets âgés de 3 semaines pour lesquels un prélèvement de sang de 2 ml est possible (hebdomadairement) sans altérer leur physiologie plutôt que de choisir des poussins pour lesquels ce volume de prélèvement impliquerait un plus grand nombre d'animaux.

-Raffinement : De par la nature infectieuse de l'expérimentation envisagée, l'hébergement des animaux sera réalisé en isolateur pendant toute la durée de l'infection. Afin d'assurer le bien-être des animaux, ces isolateurs auront une taille adaptée à leur nombre et à leur âge et un

enrichissement social (jouets suspendus) y sera installé. Au cours de cette étude, nous serons assistés par les animaliers dont l'expérience, notamment dans la manipulation des volailles, nous permettra de réaliser les inoculations (intramusculaires) et prélèvements sanguins rapidement afin de réduire le stress des animaux. Le matériel utilisé pour ces procédures et la voie d'inoculation seront adaptés à la taille des poulets pour que la douleur occasionnée puisse être classée légère. Le développement de la maladie de Marek sera évalué sur des bases cliniques et comportementales lors d'un suivi quotidien par les animaliers et/ou des chercheurs associés au projet.

13613 Titre du projet: Rôle du claustrum activé pendant le sommeil paradoxal dans la consolidation mnésique émotionnelle et spatiale chez la souris

Mots clefs : sommeil, mémoire, cortex, souris

Ce projet de recherche fondamentale vise à déterminer si l'activation au cours du sommeil paradoxal d'une structure sous-corticale peu connue se projetant diffusément sur le cortex, le claustrum, est importante pour la mémoire.

Le sommeil chez les mammifères s'organise en deux états distincts, le sommeil lent caractérisé par un ralentissement de l'activité sur l'électroencéphalogramme et le sommeil paradoxal (SP) avec une activité cérébrale similaire à celle de l'éveil paradoxalement associée à une paralysie du corps. Ce deuxième sommeil est le principal siège de l'activité onirique qui a la plupart du temps un fort contenu émotionnel. L'hypothèse classique suggère que le SP serait un état cérébral favorable au renforcement des souvenirs importants et pertinents pour l'individu.

Dans ce projet de recherche, nous proposons d'étudier le rôle potentiel dans la consolidation mnésique de l'activation du claustrum au cours du SP. Pour tester cette hypothèse, nous utiliserons une souche de souris de type transgénique (dite TRAP2) chez laquelle nous pouvons manipuler l'activité électrique des neurones d'intérêt au sein du claustrum. Ces souris seront soumises successivement à deux apprentissages associatifs simples. Pendant les quatre heures qui suivront chaque apprentissage, les neurones du claustrum seront sélectivement inhibés pendant chaque épisode de SP. D'après notre hypothèse de travail, cette inhibition de l'activité du claustrum appliquée spécifiquement pendant le SP post-apprentissage devrait avoir un effet délétère sur l'apprentissage de ces deux tests comportementaux, supportant une implication conjointe du claustrum et du SP dans ces processus mnésiques.

Ce projet de recherche fondamentale prévoit l'utilisation sur 5 ans de 180 souris TRAP2 réparties en 5 lots expérimentaux mâles et femelles de type transgénique. Toutes seront mises à mort en fin de procédure pour des analyses post-mortem des cerveaux. Tous les animaux sont implantés sous anesthésie. Après une période de récupération ils sont enregistrés en barils individuels puis privés de SP et reçoivent une injection I. P de 4-OH-Tamoxifen. Une semaine après, ils sont successivement soumis à un conditionnement à la peur et au test d'apprentissage de la position d'objet. Ils sont en suite perfusés. Chacun de ces actes induit un stress faible ou modérée. Une prise en charge de la douleur est réalisée pendant et après l'implantation. Chaque acte est également espacé dans le temps pour diminuer le stress. Un suivi du bien être animal est de plus réalisée quotidiennement. Un effort sera porté pour répondre explicitement aux principes et exigences des 3R:

Remplacement: Le SP est un état de vigilance spécifique aux mammifères. Son étude ne peut être conduite sur des animaux de niveau phylogénétique inférieur (mouche, poisson rouge, c-elegans). La neuroimagerie humaine, la modélisation *in silico* ou les cultures cellulaires ne constituent pas encore d'alternatives crédibles au modèle rongeur pour l'étude de mécanismes cellulaires de la mémoire et de l'apprentissage. C'est pourquoi nous profiterons des avantages que procure l'utilisation de souris de type transgénique qui, combinées aux nouveaux outils génétiques et moléculaires (optogénétique et chémogénétique), permettent d'atteindre in-vivo des échelles d'analyse incroyablement fines (de l'ordre de la milliseconde et du micromètre) de ces processus neurobiologiques complexes. Enfin, les réseaux neuronaux que nous ciblons sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme.

Réduction: La petite taille des lots de souris a été calculée au plus juste à partir de nos études antérieures utilisant les mêmes outils d'optogénétique, chémogénétique et/ou tests comportementaux dans le but de générer des données reproductibles dont la significativité sera validée par les tests statistiques adaptés (petits échantillons). Elle tient donc compte des « erreurs et échecs » qui peuvent survenir à chaque étape de la procédure expérimentale depuis la préparation des animaux sous anesthésie mais aussi lors des tests expérimentaux pour lesquels il est connu qu'un nombre non négligeable d'animaux ne répondent pas de manière satisfaisante, nécessitant de facto leur retrait des échantillons expérimentaux.

Raffinement: De par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil et de la mémoire requiert que les individus soient constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les différentes étapes de la procédure expérimentale sont maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnels compétents, formés et suivis dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue l'expérimentation animale. Par précaution, nous avons fixé des critères d'interruption des expérimentations et d'exclusion (douleur, souffrance physique et psychique, agressivité, perte de poids) estimés grâce à une grille d'évaluation quotidienne, leur impact étant manifestement délétère sur le sommeil (insomnie, fragmentation du sommeil) et sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation.

13614 L'instabilité vésicale est un trouble urologique chronique qui se caractérise par une envie soudaine et fréquente d'uriner. Cette envie peut survenir le jour ou la nuit et peut être accompagnée de fuites urinaires.

Quand on souffre d'instabilité vésicale, le muscle lisse de la vessie, le détroiseur se contracte de façon involontaire même quand la vessie n'est pas pleine, ce qui provoque une envie soudaine et parfois extrêmement pressante d'uriner.

Les principaux symptômes de l'instabilité vésicale sont une urgenturie (besoin soudain d'uriner qui est incontrôlable et difficile à retarder) et dans certains cas une polyurie (augmentation de la fréquence mictionnelle) ainsi qu'une incontinence urinaire (fuites urinaires involontaires). Le syndrome de la vessie instable pose problème au quotidien : besoin d'avoir des toilettes à proximité en permanence, fuites urinaires... Cela peut créer un handicap aussi bien au niveau personnel que professionnel et affecte sérieusement la qualité de vie de nombreux patients.

Des études épidémiologiques réalisées sur 19 165 hommes et femmes (Canada et Europe) ont montré que 62. 5% des hommes et 65% des femmes présentent des symptômes au niveau du tractus urinaire bas (LUTS) : chez l'homme, l'instabilité vésicale se présente principalement chez des patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate (soit 70% des hommes de plus de 70 ans), chez la femme on considère que 16% de la population européenne et américaine présentent une incontinence urinaire (associée à une instabilité vésicale).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la fonction vésicale instable par obstruction partielle de l'urètre chez le rat éveillé ou anesthésié. Actuellement les méthodes alternatives permettant une évaluation de la fonction vésicale sont inexistantes. De ce fait, le recours à l'expérimentation animale reste incontournable.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement de l'hébergement (tel que des refuges, des tunnels, des aspen brick, ...) sera introduit auprès des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1710 rats en raison de 14 à 20 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 10 à 12 animaux inclus). En effet, l'obstruction partielle de l'urètre provoque une rétention urinaire et une mortalité d'environ 30 à 40%. Cette dernière est réalisée sous anesthésie gazeuse et consiste à effectuer une obstruction partielle de l'uretère en ligaturant partiellement l'uretère avec du fil chirurgical. Après l'obstruction urétrale, les animaux recevront une injection sous-cutanée de Ketofen 1% et une injection et de gentamycine. Ce traitement sera répété pendant 3 jours après l'intervention chirurgicale. Pendant cette période les animaux seront contrôlés

2 à 3 fois par jours puis pendant les 6 à 8 semaines qui suivent cette intervention, l'état général des animaux sera observé quotidiennement et le suivi du poids des animaux sera effectué 1 à 2 fois par semaine. Les animaux présentant des signes de souffrance, un amaigrissement important (perte supérieure à 20% du poids initial avant la chirurgie avec prostration, piloerection) et/ou une cavité abdominale gonflée associée à une prostration, piloerection seront sacrifiés. L'état général des animaux sera contrôlé quotidiennement sauf après l'intervention chirurgicale concernant l'obstruction urétrale où les animaux seront contrôlés deux à trois jours par jours pendant 3 à 4 jours.

Une étude type comprendra 6 groupes expérimentaux à savoir 1 groupe contrôle (pas de geste chirurgical), 1 groupe Sham (chirurgie + analgésique), 1 groupe véhicule (chirurgie + véhicule), 3 groupes intérêts (chirurgie + test médicaments (une molécule de référence + 2 molécules à tester). Le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermo-régulée. Pour certaines interventions chirurgicales, un anesthésique local pourra être utilisé.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation qui nous permet dans la mesure du possible (c'est-à-dire quand il n'y a pas de prétraitement) de mesurer la valeur basale de chaque animal. Ainsi si nous mesurons la valeur basale de chaque animal, cela permet de comparer chaque animal à lui-même. Cette stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et ainsi de réaliser ce projet selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

13615 Le mélanome cutané est une tumeur issue de la transformation maligne de mélanocytes, cellules responsables de la synthèse des pigments photo-protecteurs contre les UV.

Les mélanomes cutanés sont des tumeurs malignes qui se développent à partir des mélanocytes de la peau. Ces tumeurs extrêmement agressives peuvent être traitées de façon relativement simple par exérèse chirurgicale lorsqu'elles sont prises en charge précocement. Cependant, leur haut potentiel métastatique provoque l'apparition fréquente de métastases ayant pour conséquence un pronostic vital très négatif.

Ce projet vise à tester et évaluer l'efficacité de thérapies personnalisées dans le cadre des mélanomes cutanés. La mise en culture de cellules dérivées de tumeurs est indispensable pour l'étude du fonctionnement de ces cellules cancéreuses ainsi que l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies. Cependant la mise en culture de ces cellules présente un taux d'échec relativement important et de plus les effets observés *in vitro* sont également éloigné du contexte physiologique. Pour améliorer cela et pouvoir proposer des traitements personnalisés pertinents, nous désirons mettre en place un modèle de souris avatars ou PDX (Patient-Derived Xenograft). Le principe des souris « avatars » repose sur la réalisation d'une xénogreffe de cellules issues des biopsies de patients dans des souris immuno-déficientes, ici les souris NSG. Les cellules greffées vont ensuite proliférer et former une tumeur au sein de l'animal. Ces tumeurs sont prélevées, dissociées à nouveau puis réinjectées dans plusieurs souris permettant ainsi de tester différents traitements sur des souris portant une tumeur ayant la même origine. Ces souris peuvent donc être utilisées afin de tester l'efficacité de différentes drogues sur les tumeurs de manière personnalisée et dans un contexte *in vivo* plus relevant que les tests réalisés sur des modèles de culture cellulaire *in vitro*. Les souris seront surveillées au cours des phases de croissance tumorale ainsi que des phases de traitement afin de prendre en compte leur bien-être ainsi que leur éventuelle souffrance. Suite à la greffe des cellules en sous-cutanée au niveau du flanc, les cellules forment une tumeur localisée sous la peau qui ne forme pas de métastases limitant ainsi les dommages subis par l'animal. Dans ce modèle de souris NSG et avec ce type de cellules tumorales, le taux de réussite de prise tumorale avoisine les 100% et permet ainsi de limiter le nombre de souris utilisées. En ce qui concerne le remplacement, les traitements évalués *in vivo* seront préalablement choisis en fonction de tests *in vitro* réalisés au préalable ainsi que sur le profil mutationnel des tumeurs

étudiées. Dans le cadre de la réduction du nombre d'animaux utilisés, ces analyses préalables à l'expérimentation sur l'animal permettent de mieux cibler les traitements à évaluer *in vivo* et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet. Ce nombre est évalué à 3900 souris pour une durée de 5 ans. En termes de raffinement, tout le long de chacune de ces expériences, les animaux seront maintenus dans un milieu enrichi et seront hébergés en portoirs ventilés à raison de 5 souris/cage (500cm²). De plus, les souris seront observées quotidiennement par les animaliers et de façon exhaustive deux fois par semaine par les demandeurs du projet afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort.

L'objectif de ce projet est de proposer des alternatives aux patients en échec thérapeutique dans le cadre du mélanome cutané.

13616 Les maladies du monde moderne occidental (obésité, diabète, maladie de Crohn...) sont toutes associées à une diminution de la diversité du microbiote intestinal (DDM) c'est à dire avec moins d'espèces bactériennes dans l'intestin. Il est toutefois difficile de comprendre quel facteur de risque clé de notre mode de vie actuel peut entraîner une DDM. L'alimentation, l'amélioration des conditions d'hygiène, l'utilisation d'antibiotiques... joueraient un rôle. Des études récentes ont montré des associations entre parasites, bactéries et santé humaine. On pourrait alors envisager que la perte de parasite (liée à une plus grande hygiène et/ou à des modifications de notre alimentation) ait pu modifier notre microbiote intestinal. Par analogie, il a été montré que la réintroduction des loups en forêt permet de restaurer la biodiversité. Nous proposons de réintroduire un parasite ; prédateur bactérien qui se nourrit des bactéries qui sont dans la lumière intestinale. Les expériences seront réalisées chez des souris C57BL6 sans modification génétique et auront pour but de montrer que le prédateur permet de prévenir et/ou de corriger un déséquilibre du microbiote intestinal avec DDM sur trois modèles décrits dans la littérature : un modèle d'obésité induite par un régime riche en graisses, un modèle d'antibiothérapie courte et un modèle de maladie du « foie gras » non-alcoolique (NASH) avec présence de fibrose et d'inflammation. Ce dernier modèle sera analysé en fin d'expérimentation par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) pour analyser le degré de stéatose du foie (accumulation de graisse dans les cellules du foie).

Ces études pourraient alors montrer l'effet bénéfique des parasites non pathogènes sur notre santé. Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

Remplacer : L'étude du microbiote intestinal et ses interactions complexes ne peuvent être réalisées que sur des animaux car aujourd'hui aucun système cellulaire ne permet de reproduire le développement de l'intestin *ex vivo*. De plus, nos études reposent sur l'étude du microbiote intestinal dont la majorité des espèces ne peuvent pas être cultivées hors de l'organisme lui-même.

Réduire : Toutes les expérimentations réalisées utiliseront le nombre d'animaux minimum de façon à tirer des conclusions statistiquement fiables. Ce projet nécessitera l'utilisation de 168 souris sur une durée de 3ans.

Raffiner : Pour le modèle d'obésité et de NASH les souris seront réparties dès le début par 3 dans la cage, afin que les animaux aient suffisamment de place malgré leur prise de poids. Pour le modèle d'antibiothérapie, l'antibiotique sera administré par voie sous cutané sur animaux vigiles pendant 4jours, afin de réduire temporairement et spécifiquement le microbiote intestinal et non dans un but d'antibiothérapie vétérinaire. Enfin l'IRM sera réalisée sous anesthésie gazeuse.

Les animaux seront surveillés par un personnel qualifié et les points limites seront notés deux fois par semaine par l'opérateur. Si les points limites définis sont atteints, cela conduira à la mise à mort de l'animal concerné.

Tous les animaux sont sacrifiés en fin de procédure.

13617 Notre projet vise à comprendre comment les facteurs liés au mode de vie peuvent accélérer le développement de la maladie d'Alzheimer. Ceci est basé sur notre compréhension que (a) la MA est considérée comme une maladie multifactorielle induite à la fois par des dysfonctionnements indépendants et dépendants de l'amyloïde ; (b) la MA commence plusieurs années avant

l'apparition des symptômes cliniques ; (c) les facteurs de risque liés au mode de vie peuvent avoir un rôle causal dans son développement. Le diabète de type 2 (DT2) est un facteur de risque important pour le développement de la MA et partage des pathologies similaires avec la MA. Il est également soumis à des facteurs de risque, notamment l'obésité, qui peut être induit par une consommation excessive d'aliments riches en matières grasses et en calories.

Notre hypothèse est que la consommation chronique de malbouffe favorisera le développement du DT2, ce qui exacerbera le dysfonctionnement du cerveau afin d'accélérer le développement de la MA et de la démence qu'elle induit. Notre projet est conçu pour imiter plus étroitement le processus de la maladie humaine. À cette fin, nous mènerons des études longitudinales, sur 10 à 12 mois, pour identifier et comprendre les dysfonctionnements / pathologies induits par l'obésité et le DT2 qui contribueront à la MA, s'ils ont ou non un effet causal et quand ils se développent. Au cours de cette période, nous effectuerons des tests répétés pour suivre l'évolution de l'obésité et du DT2 ainsi que les effets sur la pathologie de la MA et les dysfonctionnements de la mémoire associés à la maladie.

Dans ce projet, un maximum de 270 rats mâles sera utilisé dans 3 expériences en série. La règle des 3R est appliquée dans la mesure où (1) le projet a été conçu pour limiter le nombre de rats au minimum et chaque expérience ultérieure permet de réduire encore le nombre de rats/groupe et de supprimer les groupes le cas échéant selon les résultats de l'expérience 1. Différents paramètres seront étudiés chez les mêmes animaux. (2) Les techniques douloureuses et stressantes seront minimisées grâce à l'utilisation d'anesthésie et d'analgésiques lors de procédures invasives. Les rats seront continuellement surveillés jusqu'au retour dans leur habitat. Ils seront logés autant que possible dans un environnement enrichi et suivis tous les jours. Tout signe de stress ou de douleur impliquera un traitement immédiat ou une élimination des procédures expérimentales. (3) Le projet est basé sur nos expériences précédentes imitant de plus près le développement humain de la maladie d'Alzheimer et donc l'utilisation d'animaux vivants est impérative.

13618 Les troubles du comportement social affectent plus d'une personne sur cent de nos jours et leur nombre est en constante augmentation. Les substrats moléculaires communs sous-jacents au comportement social qui sont dérégulés dans ces troubles ne sont toujours pas identifiés à ce jour. Récemment, les ARN messagers régulant la connectivité et la plasticité synaptique semblent jouer un rôle important dans l'étiologie de ces troubles. Nous avons mis en évidence que les transcrits codant pour l'ocytocine et le marqueur de plasticité synaptique Arc étaient communément dérégulés dans plusieurs modèles de souris souffrant de déficits d'interaction sociale. Néanmoins, leur rôle dans l'interaction sociale et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans leur dérégulation dans ces troubles ne sont pas connus.

L'objectif de cette étude est d'étudier le rôle physiologique et pathologique des transcrits de 1) l'ocytocine et 2) Arc dans l'interaction sociale.

Ces expériences vont significativement contribuer à l'augmentation des connaissances scientifiques de ces troubles, et également de développer des nouvelles approches thérapeutiques pour soulager ces troubles.

Le nombre total d'animaux dans ces expériences sera d'un maximum de 7744 souris. Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : il n'y a aucune méthode de remplacement pour l'étude de l'interaction sociale.

Réduction : notre étude met en place des conditions spécifiques bien identifiées à l'utilisation chaque sous-groupe d'animaux et à chaque étape du projet. Dans chacun des groupes expérimentaux, la méthode ou le modèle qui semble la plus approprié sera préalablement testé, si les résultats sont probants directement, les autres méthodes ou modèles ne seront pas utilisés. De plus, si aucun effet genre n'est observé dans les premières expériences, les effectifs seront réduits de 50%.

Raffinement : La durée des procédures pour chaque animal est la plus brève possible afin de minimiser son inconfort et son stress. De plus, certaines de ces expériences mettent en place des approches thérapeutiques génétiques et pharmacologiques afin de rétablir les niveaux des

transcrits Arc ou de l'ocytocine ou compenser la diminution de leur niveau d'expression afin de restaurer l'interaction sociale, et donc le bien-être des animaux souffrant de déficit d'interaction sociale. Pour les animaux isolés, un enrichissement supplémentaire leur sera apporté, en plus du nid en carton, avec des frisures de papier kraft diminuant leur stress et facilitant leur thermorégulation.

13619 Dans les jours qui suivent la séparation des porcelets de leur mère, de la diarrhée est souvent observée chez les jeunes animaux. Ces troubles s'expliquent principalement par un déséquilibre de leur flore intestinale. L'usage d'antibiotiques permet de prévenir ces désordres. Or, dans la perspective de promouvoir des systèmes d'élevages durables, diminuer l'usage de ces antibiotiques est un enjeu majeur. Le transfert de gènes dans l'environnement et la chaîne alimentaire peut en effet favoriser le développement de bactéries résistantes aux traitements antibiotiques et être responsable de problèmes de santé publique.

La dynamique et la diversité de la flore intestinale, en fonction de l'âge et des conditions de sevrage des animaux, ont été analysées au cours d'un programme de recherche multipartenarial. Ce travail a permis d'établir une relation entre la composition du microbiote et la robustesse des porcelets au moment du sevrage. Deux mélanges bactériens contrastés, spécifiques du niveau de robustesse des porcelets, ont été identifiés et sélectionnés.

Cette saisine propose d'étudier l'impact de ces deux flores sur la réponse immunitaire intestinale locale des porcelets. Les mélanges bactériens seront administrés à 24 porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS), âgés de 24 heures (12 porcelets par mélange), et élevés pendant 14 jours dans des isolateurs stériles (une flore par isolateur). L'implantation de la flore sera évaluée grâce à des écouvillons rectaux. L'état de santé des animaux sera apprécié au quotidien par des examens cliniques (température rectale, pesée, prise alimentaire, note de léthargie, d'anorexie, de déshydratation et de diarrhée). Les porcelets seront euthanasiés et autopsiés après 14 jours d'expérimentation. Divers prélèvements biologiques seront réalisés afin d'apprécier la réponse immunitaire intestinale locale.

Les résultats de ce travail doivent contribuer à la mise en place de stratégies alimentaires qui modifieraient la composition de l'écosystème digestif des porcelets vers une flore avantageuse au moment du sevrage. La procédure sera conduite dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés (24 porcs) au seuil de la pertinence statistique ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement (présence d'objets manipulables dans les parcs, accès à une alimentation liquide, etc.). Le remplacement n'est pas envisageable, les animaux étant nécessaires pour la réalisation de cette étude.

13620 Lors du développement d'un nouveau médicament à usage humain, il est indispensable de connaître ses propriétés pharmacologiques et son comportement dans un organisme.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule ou d'une combinaison de nouvelles molécules chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Ce projet a pour objectif d'augmenter la qualité scientifique des études menées chez l'animal par le raffinement de la procédure de prise de température corporelle. En effet, elle est pour l'instant majoritairement suivie par prise rectale. Cela a deux inconvénients majeurs : l'acte est un moment de stress pour l'animal et les données obtenues sont donc potentiellement biaisées et inexploitable. L'implantation intra-abdominale d'une puce d'enregistrement continu de la température corporelle permettrait d'accéder à des données fiables sans aucun stress pour l'animal et de manière continue. Cet acte sera réalisé sous anesthésie générale avec une chirurgie d'implantation de la puce avant le début d'étude et une chirurgie d'explantation de la puce à la fin de l'étude afin de récolter les données enregistrées pendant l'étude.

L'utilisation du modèle primate se justifie par la spécificité des molécules à étudier, à terme en intégrant cette procédure de suivi de température de manière systématique. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain et l'Homme. Il est donc légitime de

penser que les résultats observés chez eux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiologiques chez l'Homme. L'objectif, par l'implant de ces puces, est de raffiner l'utilisation du primate en recherche biomédicale et de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Il est estimé d'utiliser au maximum 2 animaux (2 macaques cynomolgus) durant les 5 années couvertes par le projet. Ce nombre est jugé suffisant pour générer des données de reproductibilité et pour mettre au point et raffiner cette procédure de suivi intra-abdominal de la température. Il a été réduit au maximum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme. Ces animaux seront tous issus d'un élevage agréé. Pour chaque procédure réalisée, il sera veillé à utiliser un nombre minimal et suffisant d'animaux pour que les résultats soient interprétables et transposables à l'Homme.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront déterminées au préalable de la réalisation de chaque procédure. Dans le cas où les animaux feront l'objet d'une réutilisation, un avis vétérinaire sera obligatoire pour justifier du bon état de santé de l'animal. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

13621 Les maladies vectorielles sont des maladies transmises à l'homme ou aux animaux par le biais d'un arthropode (insecte ou acarien) piqueur. Une des maladies vectorielles les plus importantes en Europe chez le chien est la leishmaniose, causée par un parasite zoonotique (transmissible à l'homme), *Leishmania infantum*, lui-même transmis par la piqûre d'un petit moucheron, le phlébotome (genre *Phlebotomus* en France). Le chien infecté le reste à vie et peut déclarer la maladie qui se manifeste par des signes cutanés et viscéraux, et qui sans traitement conduiront à la mort de l'animal. Le chien infecté représente également une source de parasites pour l'homme. Cette maladie présente dans 80 pays du monde est en extension en France et en Europe.

La prévention passe par l'administration aux chiens d'antiparasitaires externes empêchant les phlébotomes de piquer et donc de transmettre le parasite. Le traitement des chiens déjà infectés est également important : en effet ces animaux restant infectés à vie, ils constituent des sources d'infection potentielle pour les phlébotomes, pouvant par la suite piquer l'Homme.

De nombreux antiparasitaires externes sont développés afin d'avoir un effet répulsif (empêchant de piquer) et insecticides (tuent après la piqûre). Après détermination de leur efficacité *in vitro*, ces produits doivent être testés sur l'espèce cible *in vivo*, ici le chien, au cours d'études cliniques contrôlées et standardisées. La réalisation de ce type d'études répond à des obligations réglementaires pour que le futur produit obtienne une Autorisation de Mise sur la Marché ou AMM.

L'objectif de notre demande est d'obtenir une autorisation pour tester l'efficacité d'antiparasitaires destinés à protéger les chiens contre les piqûres de phlébotomes, sur une durée de 5 ans, période au cours de laquelle nous réaliserons deux études par an. Chaque étude ayant pour objectif de déterminer l'efficacité d'un antiparasitaire différent. Nous serons en effet amenés à tester différentes molécules sous différentes présentations galéniques: colliers, comprimé et pipette.

Pour cela nous réaliserons deux types d'étude par an au cours des 5 prochaines années:

- une étude "longue" d'une durée de 9 mois, ayant pour but de tester l'efficacité de collier antiparasitaire (dont la durée de prévention est généralement de 9 mois). Pour cette étude longue, nous utiliserons 14 chiens: 7 chiens portant le collier à tester et 7 chiens sans collier ou avec un collier placebo (ne contenant aucun produit chimique). Etant donné la durée de l'étude, il arrive parfois qu'un chien perde son collier, dans ce cas là il doit être retiré de l'étude. Pour pallier à cet éventuel problème, nous utilisons 7 chiens par groupe, au lieu de 6 qui est le nombre minimal d'individu par groupe permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, et le nombre minimal réglementaire requis par les guidelines.

- une étude "courte" de 50 jours, ayant pour but de tester l'efficacité d'un comprimé ou d'une pipette contre les phlébotomes. Pour cette étude courte, nous utiliserons 3 groupes de 6 chiens, soit 18

chiens au total: un groupe de chiens témoin négatif, ne recevant aucun produit ou un placebo (comprimé sans principe actif ou pipette ne contenant que l'excipient, sans principe actif), un groupe de chiens traités avec le produit à tester, un groupe de chiens traités avec un produit antiparasitaire ayant la même forme galénique (comprimé ou pipette) et déjà disponible sur le marché pour la même indication ("protection contre les piqûres de phlébotomes"), qui servira de témoin positif. Lorsque l'efficacité d'un nouveau produit est en cours d'évaluation, il est nécessaire de la comparer à celle de produits déjà existants sur le marché. Nous utiliserons ainsi le nombre minimal de chiens par groupe permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Les locaux d'hébergement sont les mêmes que ceux de l'expérimentation. Ainsi lors de la mise en place d'une étude, les chiens ne subissent pas de changement particulier, si ce n'est éventuellement le box dans lequel ils sont placés. Ils seront acclimatés à leur nouveau box au moins 15 jours avant le jour du traitement. Chaque chien dispose d'un box individuel de 4 m², recouvert de copeaux et nettoyé quotidiennement. Il dispose également d'un caillebotis surélevé sur lequel il peut se coucher, ainsi que de jouets (balles, kongs ...), et d'un distributeur automatique d'eau. La radio, jouant musique et voix, est laissée toute la journée (de 07h à 17h).

Les boxes sont séparés par du grillage permettant aux animaux de se voir. Les chiens sont logés par deux sur 8 m² (séparation entre deux boxes maintenue ouverte). Pour éviter toute bagarre lors de la distribution quotidienne d'aliment, la séparation grillagée séparant deux boxes est fermée, puis réouverte à la fin du repas.

Les guidelines liées à ce type d'études réglementaires requièrent un contact d'une heure avec les insectes. Ainsi chaque animal sera mis en contact pendant une heure une fois par semaine (lors du premier mois, puis une fois par mois pour les mois suivants) avec 80 phlébotomes contenus dans un filet individuel. Afin d'éviter tout stress à l'animal (isolement dans un filet) et douleur (piqûre par les insectes), celui-ci est anesthésié. A la fin de l'anesthésie, les chiens sont retirés du filet et replacés dans leur box respectif et surveillés avec attention pendant la phase de réveil. La comparaison du nombre de phlébotomes gorgées et morts chez les témoins et les traités permet de calculer l'effet antigorgement ou répulsif du produit, ainsi que son effet insecticide.

A la fin de l'étude, les chiens sont maintenus en vie et restent dans la colonie de l'établissement utilisateur. Après un temps de pause suffisant, les animaux peuvent resservir à d'autres études.

13622 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/5000 naissances mâles). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine (chromosome X) et se traduit par une dégénérescence du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles, y compris le cœur et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour. La thérapie génique est une des approches thérapeutiques envisageables pour le traitement de cette pathologie.

L'efficacité thérapeutique de la thérapie génique envisagée ici passe par le transfert dans les muscles, à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique qui est une copie miniaturisée du gène de la dystrophine humaine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine « micro-dystrophine » (MD1) fonctionnelle. Le projet présenté ici a pour but de réaliser une étude d'expression et de toxicité éventuelle de la MD1 après injection intraveineuse unique à haute dose chez le rat DMDmdx et le rat sain d'un vecteur rAAV8 codant pour la μ dystrophine MD1 humaine. Cette étude fait suite à une étude de dose précédemment menée chez le rat DMDmdx ayant permis de déterminer la fourchette de dose minimale efficace dans ce modèle et avec ce produit de thérapie génique. Parallèlement à cette étude de dose dont les résultats sont encore en cours d'exploitation, une étude de toxicité en conditions BPL a été lancée chez le rat sain et des décès inattendus ont malheureusement été observés. Une des explications possibles aux effets adverses observés parmi ces animaux sains ayant reçu le traitement à haute dose pourrait être une sur-expression toxique de la protéine MD1 au sein d'un tissu musculaire sain (notamment au niveau du muscle cardiaque) contenant déjà de

la dystrophine dite "native". L'étude présentée ici se propose d'étudier cette hypothèse et d'en déterminer le processus de mise en place.

Un maximum de 72 animaux sera inclus dans ce projet, répartis en 6 groupes expérimentaux. Deux doses différentes du vecteur seront administrées en IV à des rats DMDmdx et à des rats sains (hautes doses), ainsi que le véhicule à des rats DMDmdx et à des rats sains (groupes contrôles). Les animaux seront injectés en intraveineuse à l'âge de 4 semaines et toutes les cohortes seront suivies 6 mois post injection avant sacrifice.

Des analyses exhaustives seront réalisées chez les animaux injectés pour évaluer l'efficacité et l'éventuelle toxicité du traitement au niveau histologique mais aussi phénotypique (suivi hebdomadaire du poids à minima, examens cliniques hebdomadaires, évaluations neurologiques et comportementales mensuelles, évaluation de la force musculaire et de la fonction cardiaque). Des prélèvements sanguins seront également réalisés au cours de l'étude afin d'évaluer les paramètres sanguins des animaux (biochimie et numération formule sanguine) et d'étudier notamment les réponses immunes humorale et cellulaire anti-MD1 et anti-AAV8 et mesurer les taux de certains biomarqueurs circulants.

Dans le respect de la règle des 3R, nous REDUIRONS le nombre d'animaux à maximum 12 rats par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Selon les résultats, la totalité des rats ne sera peut-être pas utilisée dans chaque groupe (<12 rats par groupe), et pouvant participer ainsi à la REDUCTION. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis.

Le REMPLACEMENT d'animaux ne sera pas possible dans cette étude, car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique *in vivo*. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le mode d'administration utilisé et la dose administrée. Malgré tout, nous RAFFINERONS cette étude par un hébergement des animaux selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en places en fonction des procédures expérimentales :

-Les injections IV du vecteur (ou du véhicule pour les groupes contrôles) au niveau de l'une des veines caudales des animaux seront réalisées sous anesthésie (Etomidate (Hypnomidate®) en IP), précédée d'une prémédication analgésique (Buprénorphine (Vétergésic®) en SC). Les prélèvements sanguins pré-injection seront effectués à l'occasion de cette anesthésie.

-Les échocardiographies 2D seront réalisées sous anesthésie (Etomidate en IP).

-Les tests d'évaluation de la force (Grip test) et les tests d'actimétrie, seront effectués sur animal vigile.

L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entraîner de la souffrance chez les rats DMDmdx, l'état général de chaque animal sera surveillé de façon bi-quotidienne par le personnel animalier pour estimer une gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Ces observations seront fournies à un vétérinaire. D'autre part les rats sont hébergés selon la réglementation en vigueur, avec un enrichissement de l'environnement.

13623 L'étude s'inscrit dans un large projet industriel qui vise à décrypter les mécanismes moléculaires de toxicité des molécules dans le développement pré-industriel de 5 molécules à haute énergie (molécules permettant d'optimiser les propriétés énergétiques des carburants des fusées et satellites).

Nous sommes en charge d'étudier la tolérance aiguë et sub-chronique chez la souris normale des composés. Ce travail permettra d'avoir des éléments du niveau de risque dans le cas d'une exposition professionnelle accidentelle, suite à un dysfonctionnement des mesures de sécurité dans

les unités de productions industrielles. Ce travail permettra de sélectionner les molécules ayant le meilleur rapport performance/ sécurité d'utilisation. Cette étude permet aussi d'obtenir des données sur le mécanisme toxicologique de ces molécules, et rendre publique les risques potentiels pour les différents utilisateurs. Finalement, à plus long terme et pour quelques molécules (1-2 molécules sur les 5 testées), ce travail permettra de définir les informations indispensables pour réaliser les études réglementaires pour constituer les bases d'un futur dossier réglementaire REACH (1 à 2 molécules parmi les 4 à partir des présentes données obtenues dans cette étude), dans lequel une approche *in vivo* mesurant la toxicité globale des molécules industrielles est requise. Cette étude permet aussi d'obtenir des données sur le mécanisme toxicologique de ces molécules, et rendre publique les risques potentiels pour les différents utilisateurs.

Le choix des souris normale CD1 permet d'avoir une évaluation statistique et est classiquement utilisé dans ces approches.

Ce programme se décline en deux phases :

- Expérimentation 1 : évaluation de la tolérance des souris à des doses croissantes de composés (exposition aiguë) après administration orale (gavage) et/ou administration par voie intra-veineuse. Ceci est un pré-requis pour déterminer la dose à utiliser dans les protocoles d'exposition sub-chronique.

- Expérimentation 2 : mesure de la tolérance après exposition sub-chronique d'un mois à trois doses (ajout du composé à l'eau de boisson). Le niveau d'exposition (concentration des molécules dans l'eau de boisson) sera fonction de la concentration maximale tolérée lors de l'expérience 1 pondérée par un facteur 1, 1/2, 1/5 et des conditions physicochimiques de chaque molécule (solubilité dans l'eau, véhicule d'exposition de notre environnement).

Le but est de mettre en exergue si la molécule étudiée s'accumule au cours du temps dans l'organisme (dosage fait chaque semaine) et évaluer après 30 jours d'exposition s'il y a un risque toxique au niveau hépatique et rénal. Le risque génotoxique est évalué indépendamment en utilisant le test d'AMES (test réglementaire).

Nous allons respecter la règle des 3R ;

Réduction du nombre d'animaux utilisés afin d'obtenir une valeur statistique. Nos protocoles sont affinés afin de ne se focaliser que sur des éléments non accessibles *in vitro* (dose maximale tolérable, toxicité sub-aiguë d'organes)

Les méthodes alternatives, quand elles existent seront utilisées (détermination des métabolites des molécules sur des modèles cellulaires), tests d'AMES (test de génotoxicité), test de cytotoxicité sur lignées cellulaire....

Les antidouleurs ne sont pas administrés dans ce contexte, car ils peuvent avoir un impact sur le métabolisme des molécules étudiées et induire un biais dans les résultats.

Les souris seront mises à mort en cas d'apparition (lors des visites ou signalée par l'équipe animalière) d'un des points limites:

- Si arythmie cardiaque (cardiotoxicité) mis en évidence par des battements anarchiques de la cage torasique, rapides avec perte de connaissance de l'animal=> dislocation cervicale sous isoflurane 4%

- Si trouble du comportement de type aphasie, excitation, coma (neurotoxicité probable) => dislocation cervicale sous isoflurane 4%

- Si oligourie, deshydratation, perte de poids rapide >10% => dislocation cervicale sous isoflurane 4%

- Si hépatotoxicité => dislocation cervicale sous isoflurane 4%

La procédure expérimentale relève d'une classe de gravité modérée et ne nécessite pas l'usage d'analgésique.

Les animaux sont élevés dans des conditions sanitaires SPF, en portoir ventilé. La formation de « nid » par les souris est rendu possible grâce à l'ajout de coton à chaque change de cage.

Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal.

Le nombre d'animaux est de 350 souris

13624 Le cancer colorectal (CCR) est une des principales causes de mortalité par cancer dans le monde. On retrouve fréquemment chez les patients atteints de CCR, des mutations des gènes suppresseurs de tumeur Apc et p53. De nombreuses études ont d'ailleurs montré l'importance de ces gènes dans l'initiation du CCR chez l'homme, mais également dans la tumorigenèse et dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

Le cancer colorectal est une pathologie spontanée qui met donc en jeu des modifications génétiques complexes. Etant donné cette complexité, et le manque de données provenant des modèles de culture cellulaires, il est indispensable d'utiliser des modèles animaux pour reproduire *in vivo*, les changements moléculaires spécifiques que l'on rencontre dans ce cancer chez l'homme.

Le but de ce projet est de développer de nouveaux modèles murins pour l'étude de la pathogénèse du CCR, ainsi que de nouvelles approches de son traitement, basées sur des modifications génétiques du gène Wip1. Nous étudions ce gène car c'est une cible émergente dans le domaine de la recherche sur le cancer. En effet, Wip1 sensibilise les tumeurs déficientes en Apc à l'activité de la voie de signalisation de p53.

D'autre part, ces modèles murins nous permettront d'évaluer le rôle des cellules souches intestinales dans le développement du CCR, et les mécanismes de leur transformation en cellules souches initiateuses de tumeurs et en cellules souches cancéreuses. Les cellules souches cancéreuses pourraient alors servir de biomarqueurs potentiels, pour évaluer l'efficacité des thérapies actuelles, et également de cibles pour le développement de nouveaux traitements anticancéreux.

Par conséquent, la création de modèles murins transgéniques de tumorigenèse intestinale nous permettra de vérifier *in vivo*, les bienfaits de la stratégie d'inhibition de Wip1 dans le traitement du CCR utilisé en monothérapie et en combinaison avec d'autres médicaments anticancéreux.

Les souris ne pouvant être remplacées par une étude *in vitro*, nous veillerons à respecter la règle des 3R en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés, et en appliquant les points limites établis.

Nous estimons à 700 (345 pour la phase expérimentale) le nombre total d'animaux qui seront utilisés dans ce projet. Nous devons d'abord obtenir trois lignées transgéniques de modèles murins de tumorigenèse intestinale (dont les phénotypes sont dommageables). Elles seront générées par croisements. Ensuite, nous constituerons des lots de 20 à 25 souris pour tester nos différentes conditions expérimentales. Ce nombre d'animaux par lot a été réduit au minimum et a été estimé à partir de notre expérience dans le design d'études similaires. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs, étant donné l'importante variabilité de la tumorigenèse (notamment la variabilité du nombre de tumeurs que l'on s'attend à avoir dans chaque lot).

13625 Nous analysons les mécanismes de la migration cellulaire dans l'embryon précoce de poisson. Pour ce faire, nous élevons des *Danio* afin d'effectuer de la reproduction naturelle et d'utiliser les œufs. Nos expériences portent uniquement sur l'embryon à un stade très précoce de développement (6 heures après fécondation). Aucune expérimentation n'est réalisée sur l'alevin ou l'adulte. Les adultes sont uniquement utilisés comme reproducteurs, pour l'obtention d'embryons. Lorsque les adultes atteignent l'âge de réforme (2 ans), ils sont sacrifiés. L'objet de cette demande est de valider la balnéation en eau froide comme méthode dérogatoire de mise à mort des adultes. Au vue de la littérature existante, cette technique semble en effet la méthode de mise à mort la plus humaine.

Nos travaux visent à mieux comprendre les mécanismes contrôlant les migrations cellulaires, processus impliqués chez l'homme dans des situations physiologiques (cicatrisation, défense immunitaire) et pathologiques (progression tumorale). De nombreuses études abordent cette question sur des cellules en culture. Il est néanmoins aujourd'hui très clair que les mécanismes employés par les cellules diffèrent grandement entre une boîte de culture et un organisme vivant,

impliquant la nécessité d'analyser ces phénomènes *in vivo*. Ce projet vise plus précisément à analyser la fonction de 10 gènes candidats dans le contrôle de la migration cellulaire. Ces gènes ont été sélectionnés sur la base de cribles protéomiques et/ou de la littérature. Leur fonction dans la migration cellulaire a d'abord été validée (par nos collaborateurs) sur cellules en culture. Nous analysons, par perte de fonction, leur rôle *in vivo*.

La réalisation de tels travaux sur des modèles mammifères nécessiterait le recours à des techniques invasives, voire au sacrifice des animaux. L'utilisation d'embryons de poisson permet d'éviter ces sacrifices. Par ailleurs, le modèle poisson étant largement utilisé aujourd'hui, les connaissances et les outils nécessaires à la réalisation de nos travaux sont disponibles (génomome séquencé et annoté, nombreuses lignées mutantes ou transgéniques). Nos travaux, bien qu'effectués chez le poisson seront facilement transposables aux cellules humaines, qui utilisent les mêmes mécanismes pour migrer. Un poisson adulte peut pondre une centaine d'œufs par semaine, pendant plus d'un an. Cette grande fertilité permet de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés pour produire les œufs. Sur la durée du projet, 750 animaux seront ainsi nécessaires à l'étude des 10 gènes candidats.

Les animaux sont maintenus dans des conditions assurant leur bien-être. Les paramètres environnementaux (température, qualité d'eau) sont surveillés, en continu pour la température, le pH et la conductivité, tous les 15 jours pour les taux d'ammoniac, nitrites et nitrates, la dureté totale et la dureté carbonatée. Le milieu de vie des animaux est enrichi par la distribution quotidienne de proies vivantes, permettant l'expression de l'instinct de chasse. Les animaux sont, autant que faire se peut, maintenus en groupe, conformément à leur nature grégaire. Le bien-être des animaux est surveillé quotidiennement, par la recherche de signes comportementaux ou physiques indicateurs de stress, de douleur ou de pathologie. En cas de doute, nous nous adressons à notre vétérinaire référent, spécialiste des poissons. Les animaux atteignant l'âge de réforme (2 ans) sont sacrifiés par balnéation en eau froide.

13626 L'insuffisance rénale chronique (IRC) se caractérise chez de nombreux patients par un état de dénutrition chronique pouvant aboutir à une cachexie (c'est à dire une perte importante de poids). Le développement d'une dénutrition ou d'une cachexie est un facteur extrêmement péjoratif pour les patients IRC car il s'accompagne d'une surmortalité. Mieux comprendre les mécanismes qui sous tendent le développement d'une dénutrition ou d'une cachexie sont donc d'une grande importance clinique.

Des études réalisées dans notre laboratoire sur des modèles animaux d'insuffisance rénale chronique ont montré une perte de tissu adipeux blanc associée à une transformation de ce tissu en tissu adipeux brun, phénomène appelé "browning" ou "brunissement", et à une augmentation de la dépense énergétique. L'activation du tissu adipeux brun est classiquement associée aux états de cachexie dans les maladies chroniques telles les cancers car il favorise la déperdition de calories et la mobilisation des réserves énergétiques. Une transformation du tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun (un "brunissement") pourrait donc contribuer à la dénutrition et à la cachexie associée à la maladie rénale chronique. Ce phénomène de "brunissement" n'a pour l'heure jamais été observé dans l'insuffisance rénale et pourrait contribuer au désordres métaboliques et nutritionnels observés chez ces patients. Nous avons pu démontrer *in vitro* le rôle d'une hormone appelée ANP (pour Atrial Natriuretic Peptide) dans ce phénomène de brunissement et nous avons confirmé dans une étude clinique (incluant 231 patients IRC terminaux) que des concentrations élevées de cette hormone étaient statistiquement associées à un score de dénutrition plus élevé chez les patients IRC.

Ces travaux sont actuellement en cours de publication dans « *Kidney international* » (impact factor = 8,395) l'une des deux meilleures revues internationales de néphrologie. Cette publication est en révision favorable et pour qu'elle soit acceptée, il nous est demandé de réaliser deux expériences complémentaires sur des souris contrôles et des souris insuffisantes rénales chroniques. Ces expériences complémentaires nous permettront de valider fonctionnellement le phénomène de "brunissement" déjà observé chez les animaux IRC et le rôle de l'hormone ANP dans ce processus. Les deux expériences demandées sont les suivantes:

1- Démontrer que le browning du tissu adipeux blanc par des mesures fonctionnelles. Une exposition au froid permet de démasquer l'existence d'un tissu adipeux brun fonctionnel. A cette fin, l'insuffisance rénale sera induite chez la souris par une chirurgie de néphroréduction. Les souris seront alors exposées au froid pendant 8 heures afin de stimuler l'activation du tissu adipeux brun et de pouvoir caractériser fonctionnellement cette activation. L'insuffisance rénale chronique sera induite chez 12 souris tandis que 12 souris restantes serviront de contrôle. La moitié de chacun de ces groupes (soit 6 souris) sera exposée au froid (4°C pendant 8 heures) et des marqueurs de brunissement seront recherchés (expression de la protéine UCP-1, mesure du métabolisme oxydatif). Vingt-quatre souris seront utilisées dans cette expérience.

2- Nous avons démontré *in vivo* et dans une étude clinique le rôle potentiel de l'hormone appelée ANP. Il nous est demandé de démontrer qu'aux concentrations observées chez les patients IRC, cette hormone a bien pour conséquence de promouvoir le "brunissement" du tissu adipeux blanc. Des souris se verront donc administrer un médicament, le sacubitril (utilisé chez l'homme pour traiter l'insuffisance cardiaque) qui va bloquer la dégradation naturelle de l'ANP et donc en augmenter les concentrations circulantes. Des marqueurs de "brunissement" du tissu adipeux blanc seront alors recherchés (expression de la protéine UCP-1, mesure du métabolisme oxydatif) chez ces animaux. Douze souris seront utilisées dans cette expérience, 6 souris se verront administrer le sacubitril tandis que 6 souris recevront le "placebo".

Le présent protocole expérimental implique l'utilisation d'un total de 36 souris de laboratoire (souche C57Bl6 JRj).

Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la dénutrition et du risque métabolique accru des patients IRC et ainsi d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant ces anomalies (tel le blocage de l'ANP si nos expériences confirment son rôle).

Conformité à la règle des 3 R:

S'agissant d'une maladie systémique (insuffisance rénale chronique), toute expérimentation *in vitro* et/ou méthode substitutive est impossible et il nous est nécessaire de recourir à une expérimentation animale. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude (36 souris) a toutefois été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Le protocole chirurgical sera réalisé sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane offrant à la fois une bonne sécurité et un bon confort anesthésique. Un protocole d'analgésie (associant anesthésie locale per-opératoire et l'usage de dérivés morphiniques) permettra de prévenir et de contrôler les douleurs post-opératoires. Un enrichissement du milieu de vie à l'aide d'igloos en carton et de ouate de cellulose (permettant au souris de se fabriquer un nid) sera mis en oeuvre pour l'hébergement des souris.

13627 L'épithélium cornéen est une multicouche cellulaire non kératinisée qui recouvre la surface de la cornée. Il joue un rôle prépondérant dans la défense contre les agressions microbiennes (barrière physique) mais aussi dans l'optique du dioptre cornéen (transparence) et la régulation de l'activité métabolique des cellules stromales cornéennes via des facteurs de croissance. Ces cellules desquament régulièrement en surface dans le film lacrymal qui les recouvre pour un renouvellement total tous les 19 à 35 jours. Ce renouvellement est assuré par les cellules basales de l'épithélium du limbe qui entoure l'épithélium cornéen sur 360°. Elles possèdent des propriétés analogues à celles des cellules souches et sont par conséquent communément appelées des cellules souches limbiques.

L'insuffisance en cellules souches limbiques (ISCL) traduit l'incapacité des cellules limbiques à assurer le renouvellement normal de l'épithélium cornéen, que ce soit à l'état physiologiques ou lors de circonstances pathologiques. La disparition de la barrière limbique peut entraîner dans certains cas la migration de l'épithélium conjonctivale entraînant ainsi l'apparition de cellules caliciformes sur la surface cornéenne qui sont à l'origine de la perte totale de la vue par opacification de la cornée. Leur diagnostic est basé sur des tests dont la sensibilité, la spécificité, le délai, l'accessibilité et le coût ne sont généralement pas bons.

Le but de cette nouvelle étude est d'étudier l'efficacité d'un marquage *in vivo* par des biomarqueurs fluorescents innovant et spécifiques des cellules conjonctivales visualisable par les techniques d'imageries utilisées en clinique ophtalmologique. Cette expérience sera menée sur un modèle d'ISCL chez le lapin déjà publié.

Au total 24 lapins répartis en 4 groupes de 6 animaux seront utiles pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats reflètent les variations interindividuelles. Ce nombre doit obligatoirement être mis en oeuvre *in vivo* afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme.

Tout est mis en œuvre pour limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (anesthésie générale pendant la création de l'ISCL ainsi que pour les suivis). Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les lapins sont hébergés en cage réglementaire (plateforme et paroi transparente entre 2 cages) ; dans un environnement enrichi (jouet kong et autre jeux). Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

13628 L'hydrolyse contrôlée de protéines issues de coproduits agroalimentaires comme les coproduits de la pêche connaît un essor important dans la cosmétologie, dans l'industrie des additifs alimentaires et dans la nutrition et la santé animale et humaine. Ces dernières années, de nombreux peptides bioactifs produits par ces hydrolyses contrôlées ont démontrés des vertus physiologiques telles que des activités anxiolytiques. Dans le cadre de cette étude, nous testerons l'effet d'un hydrolysate de protéines issues du saumon sur la réactivité comportementale et neuroendocrine au stress chez des rats adultes après un traitement quotidien de 5 jours avec ces composés. Cette étude pourrait permettre de mettre en évidence la présence de peptides à activité anxiolytique dans ces hydrolysats et de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

Au total, 80 rats Wistar Han âgés de 2 mois, dont 40 mâles et 40 femelles, seront utilisés dans cette étude et répartis en 8 groupes expérimentaux de 10 rats.

Les procédures expérimentales sont conçues pour respecter la règle des 3R et limiter le nombre d'animaux utilisés :

- Principe de remplacement : Il n'existe pas de méthodes alternative ou de substitution nous permettant d'étudier *in vivo* l'effet d'un hydrolysate de protéines issues du saumon sur la réactivité comportementale et neuroendocrine au stress.

- Principe de réduction : Le principe de réduction a été appliqué : 10 rats/groupe/sexe sont nécessaires pour limiter les variabilités inter-individuelles des réponses au stress.

- Principe de raffinement : Les animaux sont surveillés tous les jours afin d'évaluer la présence de signes cliniques modérés de détresse au cours de leur hébergement. Le lien social entre les animaux sera maintenu. Les critères et signes qui permettent d'évaluer le niveau de douleur ou de stress ou la détresse des animaux ont été dégagés sur la base des critères établis par Morton et Griffiths (1985). Chaque procédure expérimentale sera réalisée par un personnel habilité. Lors des manipulations, les stratégies de raffinement des expériences (pièce calme, dispositions pour diminuer l'angoisse des animaux, anesthésie, surveillance de l'état d'endormissement) seront réalisées par le personnel habilité. Lors des procédures expérimentales, les critères et signes permettant d'évaluer la vigilance des animaux et la présence de signes cliniques de détresse/douleur seront particulièrement étudiés. Si un animal présente des signes cliniques de détresse au cours d'une expérimentation, celui-ci sera rapidement euthanasié pour éviter toute souffrance.

13629 La rétine, située au fond de l'oeil, est composée de différents types cellulaires, dont cinq grands types neuronaux, traitant l'information lumineuse. La rétine est le siège de nombreuses pathologies

entraînant une cécité. La lumière est captée par un neurone particulier appelé le photorécepteur (PR). Une grande partie des maladies cécitantes, comme par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou la rétinopathie pigmentaire, sont dues à la dégénérescence des photorécepteurs. Les dégénérescences rétinienne héréditaires sont hétérogènes et complexes en raison de la grande diversité de leurs causes génétiques ; on recense à ce jour plus de 180 locus impliqués dans les rétinopathies liées à la mort cellulaire des photorécepteurs. Celle-ci peut être la conséquence d'un défaut primaire des photorécepteurs ou être secondaire à un défaut de fonctionnement de la couche cellulaire sous-jacente aux photorécepteurs, appelée l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Il n'y a actuellement pas de traitement médicamenteux permettant de cibler ces maladies à long terme.

La thérapie génique, qui vise à transférer un gène thérapeutique dans les cellules cibles afin qu'elles produisent elles-mêmes le « médicament » de façon stable et prolongée, est donc une stratégie thérapeutique particulièrement intéressante dans le cas des maladies de la rétine. Pour ce faire, des vecteurs ont été développés afin de transporter les gènes thérapeutiques d'intérêt et les délivrer dans les cellules cibles. Les récents succès de la thérapie génique oculaire pour le traitement d'une dégénérescence rétinienne appelée l'amaurose congénitale de Leber dans trois essais cliniques indépendants en 2008, ont fait naître l'espoir que cette stratégie puisse être appliquée à d'autres maladies cécitantes.

Nous avons développé depuis plusieurs années des vecteurs capables de cibler spécifiquement des populations rétinienne différentes. Cependant, en cas d'administration intravitréenne d'AAV, la membrane limitante interne (ILM) - une membrane basale qui définit histologiquement la frontière entre la rétine et le vitré - constitue une barrière pour la pénétration de l'AAV dans la rétine.

Le but de notre projet est de franchir cette membrane limitante interne chez le primate non humain, en la perméabilisant transitoirement grâce à des microbulles sous excitation ultrasonore.

Les procédures sont construites de manière à optimiser le nombre d'animaux, en utilisant à chaque fois le controlatéral d'un oeil comme témoin expérimental. L'effectif est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ces animaux sont nés et élevés dans des élevages reconnus.

Parallèlement, il est nécessaire de développer des modèles expérimentaux pertinents de dégénérescence rétinienne pour pouvoir ensuite tester l'efficacité de stratégies thérapeutiques applicables chez l'homme. Aucun système *in vitro* ne peut mimer une dégénérescence rétinienne et nous informer sur un effet de population de neurones dans la rétine, nous devons recourir à des modèles animaux. Nous proposons donc d'induire un modèle de dégénérescence rétinienne chez le primate non humain. Les études préalables menées chez la souris ne peuvent être translatées de façon sûre et efficace à l'homme sans passer par une étude intermédiaire dans une espèce présentant une organisation de l'oeil comparable à celle de l'homme comme c'est le cas chez les cercopithécidés. Le choix de *Papio* spp. se trouve pleinement justifié par le fait que l'on trouve dans cette espèce une organisation du système visuel, une dimension et une structure du globe oculaire mais également de la rétine, avec la présence d'une macula (absente chez les rongeurs) comparable à celles de l'homme.

Toutes les interventions se feront sous anesthésie générale, pour réduire la contrainte imposée aux animaux, renforcée par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires appropriés, utilisés en médecine humaine.

Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro* et *in vivo* chez des modèles rongeurs et porcins. Quatre animaux au total seront nécessaires à ce projet. La mise en oeuvre d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie *in vivo* permet de diminuer le nombre d'animaux. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a signe de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en oeuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

13630 L'administration de molécules thérapeutiques biologiques (ex : anticorps monoclonaux) ne peut se faire essentiellement aujourd'hui que par voie intraveineuse ou sous-cutanée avec d'importantes contraintes pour ces deux voies d'administration. Contrairement aux petites molécules chimiques, l'administration par voie orale de molécules biologiques est aujourd'hui compliquée à cause du processus de digestion.

Ce projet consiste à évaluer de nouvelles méthodes de formulation de molécules biologiques et d'étudier la pharmacocinétique de la drogue tout d'abord dans le tissu colique mais également sa réabsorption et distribution dans la circulation sanguine. Pour ce faire, une molécule biologique test sera formulée selon différentes méthodes et des études de pharmacocinétiques après administration par voie orale chez le porc seront réalisées. Au total, un maximum de 35 porcs seront nécessaires à la réalisation de l'étude. La première phase du projet concernera une pré-étude pharmacocinétique avec un nombre faible d'animaux par groupe (5 groupes) pour identifier la meilleure formulation après administration unique. Dans un second temps la meilleure formulation sera évaluée en administration unique avec un nombre limité d'animaux par groupe (4 groupes).

Dans un souci du respect de la règle des 3R, les animaux testés seront leur propre contrôle, de façon à pallier d'éventuelles variations interindividuelles, ainsi les valeurs de différents paramètres sanguins et tissulaires analysés après administration de la molécule d'intérêt seront comparées aux valeurs individuelles initiales, permettant d'obtenir un maximum d'informations à partir d'un minimum d'animaux. De plus, si les résultats de la première phase ne sont pas concluants, la phase 2 ne sera pas initiée. De façon à diminuer le stress, la souffrance, et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

Il n'existe pas de remplacement possible pour la réalisation de ces expérimentations, cependant l'utilisation de ces animaux répond aux exigences de réduction et de raffinement.

Les porcs sont hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce, tant que la procédure, la taille ainsi que le comportement le permettent. Un enrichissement alimentaire (fruits, légumes) est apporté 1/2 fois par semaine et des jouets (ballons, porcichieus suspendus à des chaînes) sont ajoutés dans les boxes 3/4 fois par semaine de façon ponctuelle.

13631 Ce projet repose sur des méthodes invasives d'inactivation pharmacologique et d'enregistrement de l'activité cérébrale, incompatibles avec une expérimentation chez le sujet humain. L'objectif de cette étude est de comprendre comment un réseau de structures cérébrales, jusqu'à présent considéré uniquement dans sa fonction visuelle, peut également jouer un rôle fondamental dans les processus de mémorisation. D'une durée de 3 ans, il nécessitera l'utilisation de 16 rats mâles de souche Long-Evans adultes, répartis en deux groupes.

Pour le premier groupe : Des électrodes d'enregistrement de l'activité neuronale seront implantées dans une structure cérébrale appelée le corps genouillé dorso-latéral (dLGN, structure appartenant au thalamus) et des guides canules seront implantés dans une autre structure cérébrale appelée le cortex visuel primaire afin de l'inactiver de manière transitoire.

Pour le deuxième groupe : Des électrodes seront implantées dans le dLGN et des guides canules seront implantés dans l'hippocampe dorsal.

Les effets électrophysiologiques de ces inactivations seront évalués grâce à l'injection intracérébrale soit de solution saline (PBS), sans action pharmacologique, soit de muscimol fluorescent (un agoniste des récepteurs GABA qui entraîne l'inactivation de la structure-cible). Chaque animal sera donc son propre contrôle, conduisant ainsi à la réduction du nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. Les chirurgies seront réalisées grâce à un système d'anesthésie gazeuse permettant ainsi un contrôle instantané de la quantité d'anesthésique distribuée. Un système de monitoring des principaux paramètres physiologiques sera utilisé en parallèle afin de garantir le niveau d'anesthésie le plus adapté tout au long de la chirurgie. Nous utiliserons également des microdescendeurs indépendants pour les électrodes ce qui nous permettra de maximiser le nombre de neurones enregistrés simultanément et donc de réduire à la fois le nombre d'inactivations par animal et le nombre d'animaux nécessaires pour observer un effet. Nous utiliserons un système

d'enregistrement sans fil qui permettra une plus grande liberté de mouvement aux animaux au cours de la réalisation de la tâche comportementale. Les animaux seront également hébergés dans des cages standard réhaussées de 7 cm afin de garantir une liberté de mouvement plus importante (redressements). Le type de connexion magnétique utilisé dans cette étude permettra également une connexion plus aisée sans avoir à restreindre les animaux au cours de cette procédure. Enfin, ce projet repose sur des méthodes invasives d'inactivation pharmacologique et d'enregistrement de l'activité cérébrale, incompatibles avec une approche chez le sujet humain et nécessite l'emploi d'animaux vigiles.

Les résultats issus de ce projet sont susceptibles de modifier profondément et durablement la manière d'envisager le rôle des structures thalamiques dans les processus cognitifs (comme la mémorisation). L'impact de cette recherche n'affecterait pas seulement notre compréhension du système visuel chez le rongeur, mais aurait également des répercussions sur notre compréhension d'autres modèles animaux (primates non-humain et grands mammifères dans leur ensemble) mais aussi humain. Le principal dommage potentiel pour l'animal dans cette étude découle d'une perte de fonction transitoire (quelques heures) d'une modalité sensorielle (la vision).

13632 L'augmentation constante du vieillissement des populations dans les pays développés a fait des maladies neurodégénératives liées à l'âge un défi majeur pour la médecine moderne. En France, 1,2 million de personnes ont besoin d'un traitement contre le glaucome, l'une des principales causes de cécité chez les patients âgés, et au moins 1,1 million de personnes souffrent de la maladie d'Alzheimer. Malgré l'importance pour trouver des traitements et les efforts engagés pour ces maladies, la recherche basée sur l'utilisation de modèles murins n'a eu qu'un succès très limité jusqu'à ce jour. Les souris ne reproduisent que certains aspects de la maladie chez l'Homme, et des traitements pouvant être efficaces échouent bien souvent chez les patients humains. De plus, les techniques *in vitro* ont eu un succès encore plus limité, puisque les interactions entre les neurones et d'autres systèmes complexes chez l'animal, tels que le système circulatoire ou lymphatique, font totalement défaut dans ces modèles.

Ce projet propose de surmonter ces limites dans la recherche portée sur le glaucome et la maladie d'Alzheimer en étudiant ces deux maladies conjointement chez le primate non-humain (PNH), ces maladies se manifestant de manière similaire à celle des patients.

Normalement, l'étude des maladies liées à l'âge chez le PNH est très difficile car elle nécessite de trouver des animaux très âgés présentant les symptômes et marqueurs biologiques de ces pathologies. Cependant, de nombreuses études ont montré qu'il est possible d'induire un glaucome chez le primate par simple chirurgie visant à bloquer un petit vaisseau dans l'œil. Suite à l'induction, la progression du glaucome est très similaire à celle observée chez des patients humains. Ce modèle PNH de glaucome présente ainsi l'avantage de pouvoir étudier l'évolution du glaucome dès son induction, et étudier les premiers stades de sa progression, ce que ne permet pas l'étude d'échantillons de tissus provenant de vieux primates ou de dons humains, étant souvent à un stade trop avancé. En effet, l'étude des maladies neurodégénératives à un stade précoce est particulièrement importante, pour permettre d'offrir le plus de bénéfices thérapeutiques aux patients suite à leur prise en charge.

De plus, les études cliniques montrent un lien entre le glaucome et la maladie d'Alzheimer, les patients atteints par l'une des deux maladies présentant souvent l'autre. Cette corrélation clinique, combinée à d'autres observations, ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le glaucome pourrait être une forme de maladie d'Alzheimer mais spécifique à l'œil, et que les connaissances obtenues pour chacune des maladies peuvent être complémentaires. Ce lien est particulièrement frappant dans le modèle de glaucome que nous proposons chez le primate, selon lequel l'induction du glaucome entraîne non seulement le développement d'un glaucome dans l'œil, mais provoque également une accumulation de plaques séniles et l'apparition de dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau, deux marqueurs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi, chez un même animal, nous serons en mesure d'utiliser ce modèle de glaucome induit pour étudier ces deux maladies neurodégénératives : le glaucome et la maladie d'Alzheimer, le premier en regardant l'œil, et le second en regardant le cerveau.

Notre étude commencera ainsi par caractériser le profil ARN des cellules de la rétine et du cerveau de manière à comprendre comment ces cellules passent d'un stade sain pour arriver au stade pathologique. Ce profil ARN permettra ainsi de déterminer quels gènes sont activés ou désactivés dans les cellules pathologiques par rapport aux cellules saines, et comment ces gènes changent à mesure que la maladie s'aggrave.

L'obtention d'informations sur les modifications génétiques observées lors du développement du glaucome et de la maladie d'Alzheimer, nous permettra d'envisager de tester différentes stratégies pour rendre la maladie moins sévère ou la ralentir comme par la mise en place d'une thérapie génique. Nous testerons si l'augmentation de l'expression des gènes réprimés par la maladie est capable de freiner l'évolution de ces deux maladies d'un même modèle de primate. En conséquence, si nous observons une amélioration du glaucome ou de la maladie d'Alzheimer avec de tels traitements dans le modèle primate du glaucome induit, des traitements similaires seront alors des candidats de choix pour une thérapie génique chez des patients atteints de ces maladies neurodégénératives.

Règle des 3Rs : Remplacer : Nous ne pouvons dans cette étude remplacer le modèle primate par des modèles inférieurs : modèles cellulaires *in vitro* ou modèles murins car ces modèles n'ont permis d'apporter que des résultats parcellaires quant aux études menées sur le glaucome ou la maladie d'Alzheimer. En effet, l'anatomie de l'œil tout comme les circuits neuronaux qui dégénèrent dans la maladie d'Alzheimer se trouve être très différent entre la souris et l'homme alors qu'ils sont similaires entre le primate non-humain et l'homme. Le recours au modèle PNH est donc essentiel et ne peut être remplacé. Réduction : dans ce projet, 56 macaques *Cynomolgus* seront utilisés sur 5 ans et chaque animal sera considéré comme son propre contrôle. Cet effectif a ainsi été réduit au maximum pour permettre d'obtenir les réponses scientifiques escomptées. Les effectifs sont basés sur le nombre d'animaux nécessaire pour le séquençage et pour les tests de thérapie génique (choix des bons vecteurs en fonction des résultats de séquençage). Raffinement : de manière à limiter les contraintes pour les animaux, l'ensemble des interventions et examens seront réalisés sous anesthésie générale avec ajout de compléments analgésiques et anti-inflammatoires. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance et des critères de points limites ont été prévus pour prendre en compte des effets indésirables. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi (barrières visuelles, plateformes, jeux...) et recevront un programme d'entraînement à coopérer basé sur la distribution de récompenses.

13633 L'objectif de projet consiste à mesurer la valeur nutritionnelle des matières premières (céréales, co-produits, graines, tourteaux, huiles, ...), qui entrent dans la composition des aliments pour porc. Pour bien formuler les aliments, les nutritionnistes utilisent des tables d'alimentation, des matrices qui caractérisent les matières premières utilisées.

Il est indispensable de mettre à jour régulièrement cette matrice car cette matrice doit prendre en compte les variabilités annuelles des matières premières, les nouvelles origines, les nouveaux co-produits. Si ce travail n'est pas réalisé, la table d'alimentation sera vite périmée, la formulation sera mal réalisée et l'aliment sera mal valorisé par l'animal : il faudra plus d'aliment pour le nourrir, les rejets (azote, phosphore...) dans les fèces seront donc plus importants, ce qui augmente l'impact environnemental sur la planète. L'animal peut même être malade car il digère mal ce qu'on lui donne à manger à cause d'une mauvaise formulation de l'aliment.

Cette caractérisation des matières premières est donc indispensable. Or, les évaluations de ces MP à partir d'analyses chimiques restent problématiques et les techniques *in vitro* utilisant des préparations enzymatiques sont encore délicates à mettre en œuvre. De plus, elles demeurent imprécises quand on cumule l'incertitude des modèles de prédiction à celle associée à la variabilité analytique. Ainsi le seul recours est la mesure *in vivo* que nous réalisons sur 1260 porcs pendant une période de 5 ans.

Ce dispositif est indispensable pour mesurer des digestibilités de matières premières et ainsi les évaluer. Nous utilisons la méthode avec incorporation d'un marqueur dans l'aliment.

Les matières premières entrant dans la composition des aliments diffèrent entre un animal 1er, 2ème âge et croissance puisque le système digestif évolue avec l'âge. Ce dispositif est donc appliqué sur des porcs de 3 âges différents (20j, 60j, 100j). Pour chaque âge, l'essai est divisé en une phase d'adaptation puis une phase d'essai qui correspond à la phase de test des aliments avec collecte partielle des fèces de l'animal (voir annexe). En phase de collecte, la surface par animal est limitée pour faciliter la collecte et s'assurer de la bonne qualité des fèces récoltés (réduction écart-type). Hors de cette phase, les animaux sont hébergés dans un module complet.

Pour la précision de la méthode, les fèces récoltées doivent être non souillées c'est pourquoi les animaux sont élevés sur caillebotis avec récupération des fèces grâce à des plateaux de collecte sous les caillebotis. En période de collecte, les fèces sont récoltées quotidiennement.

La température est gérée automatiquement grâce à un système de ventilation. Des chauffages permettent de réchauffer l'ambiance si besoin.

Les animaux sont nourris à volonté et ont un accès libre à l'eau en permanence.

Pour enrichir le milieu, une chaîne est installée dans chaque case. Cet enrichissement efficace permet aux porcs de machouiller ce matériau.

Une fois les mesures terminées, les porcs sont ensuite replacés dans notre élevage dans des cases en groupe comme dans un élevage conventionnel.

13634 La grossesse est un évènement composé de 4 phases :

- La phase de quiescence, occupant 95% de la grossesse, phase durant laquelle le fœtus et l'utérus grossissent.

- la phase d'activation, préparant à la parturition (mise bas),

- la phase de stimulation comprenant l'entrée en travail et l'expulsion du fœtus

- et enfin la phase dite d'involution, comprenant l'expulsion des annexes fœtales, l'involution de l'utérus et la mise en place de l'allaitement.

Ces 4 phases sont les mêmes chez tous les mammifères. Toutefois, les molécules qui régissent ces différentes phases ne sont pas les mêmes selon les espèces. Chez la plupart des mammifères, le travail est déclenché par une chute de la concentration de progestérone et une augmentation de la concentration en œstrogène. En revanche chez l'Homme, le primate et le cobaye, le travail se déclenche sans modification de la concentration de progestérone. Ainsi l'administration de progestérone chez les mammifères prolonge la gestation alors que ce traitement n'a aucun effet chez l'Homme ou le cobaye.

De nos jours, les mécanismes qui déclenchent l'accouchement chez la femme sont peu caractérisés et la compréhension de ces derniers est nécessaire afin de mieux appréhender le déclenchement du travail et d'améliorer la prise en charge du travail prématuré.

Le but de ce projet sera d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur le déroulement du travail dans un modèle de parturition normal ou dans un modèle d'accouchement prématuré chez la femelle cobaye gestante. Pour cela, les femelles gestantes seront placés sous caméra (enregistrement continu et en direct permettant de définir le temps de la mise bas) dans des cages individuelles avec libre accès à l'eau et à la nourriture.

Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant d'étudier l'accouchement à terme ou prématuré dans son ensemble n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre ses mécanismes et traiter cette pathologie.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera de 330 cobayes femelles gestantes à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester et du nombre d'étude réalisé sur les 5 ans.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement adapté sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de les stimuler (tunnels ou huttes). Les animaux

seront nourris ad libitum et hébergés en groupe ; ils ne seront séparés qu'au début de l'étude ou en cas de comportement agressif. L'aliment des femelles gestantes sera supplémenté en vitamine C (1500 mg/kg) afin de répondre à leur besoin quotidien pendant la gestation.

En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermo-régulée. Pour certaines interventions chirurgicales, un anesthésique local pourra être utilisé. L'un des points limites de ce projet serait une mise basse avec des complications (notamment mort des fœtus), entraînant une souffrance de la femelle gestante et donc l'arrêt de l'expérimentation pour cet animal et sa mise à mort.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant de réaliser les expérimentations sous caméra afin de suivre un même animal sur quelques jours. Toutefois, une attention particulière sera apportée lors des toutes premières mise bas afin d'optimiser le bien-être de l'animal, avec l'ajout de nourriture dans la cage d'expérimentation ainsi que des enrichissements type mini ballots de foin pour une potentielle nidation.

13635 Dans certaines maladies comme l'obésité et le diabète, les complications vasculaires sont les conséquences des défauts de formation de vaisseaux sanguins et d'une réduction de cellules progénitrices circulantes. Par ailleurs, ces cellules sont impliquées dans la réparation d'un tissu et à la création de nouveaux vaisseaux. Nos travaux préalables au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence que vésicules extracellulaires (VE) circulantes, obtenues par bourgeonnement de la membrane plasmique de différentes origines cellulaires, sont capables d'augmenter le taux de cellules progénitrices et d'améliorer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau sanguin préexistant. La question ici posée est de vérifier si les VE seraient capables d'augmenter l'angiogenèse défaillante afin de corriger les anomalies associées à l'obésité et au diabète.

Par conséquent, l'objectif de ce travail est d'étudier les modifications phénotypiques induit par le VE sur les cellules progénitrices issues de la moelle osseuse, avec un intérêt particulière sur l'implication de PPARalpha et ApoE.

Le récepteur nucléaire « peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) » est une protéine clé dans le métabolisme des lipides. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux effets de ce récepteur sur la fonction de cellules vasculaires progénitrices telles que les précurseurs endothéliaux, nécessaires à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et qui participent à la réparation d'un tissu lors du diabète ou de l'infarctus du myocarde. En effet, il est décrit que PPARalpha pourrait être considéré comme un régulateur de l'angiogenèse et de ce fait participer à la régulation de la fonction de cellules progénitrices. Cependant, peu est connu sur le rôle de PPARalpha lors des pathologies métaboliques associées à une augmentation du taux de lipides plasmatiques et tissulaires.

Par ailleurs, ce modèle animal induit par la nourriture riche en graisse ne reproduisent pas une maladie coronarienne occlusive, ni d'anomalies cardiaques suite à une athérosclérose. Pour cela, nous souhaitons utiliser aussi un modèle hypercholestérolémique, les souris ApoE knock-out.

L'apolipoprotéine E (ApoE) est synthétisée principalement par le foie, le cerveau et aussi par les monocytes et macrophages des vaisseaux sanguins. Elle intervient dans le transport des lipides sanguins vers les tissus de stockage périphériques et hépatiques. Les souris ApoE knock-out développent une hyperlipémie à VLDL. Le régime HFD induit une hypercholestérolémie sévère et accélère beaucoup la progression de l'athérosclérose au niveau de l'aorte. Dans la littérature est connu qu'ApoE aussi est capable de favoriser la modulation des cellules hématopoïétiques. Notre objectif est d'analyser, en parallèle, le rôle de PPARalpha et d'ApoE portées par le VE sur la prolifération et la différenciation des précurseurs endothéliaux provenant de souris nourries avec un régime riche en graisses. Pour cela, nous déterminerons les modifications induites par la délétion de PPARalpha et de ApoE sur le cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation des progéniteurs endothéliaux *in vitro* et *in vivo*.

Un total de 258 souris sera utilisé.

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés :

- L'obtention des VE circulantes et de cellules progénitrices à partir de la moelle osseuse ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information ;
- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet.
- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Les résultats attendus permettront de mieux comprendre le rôle de PPARalpha et ApoE porté par les EV sur la régénération vasculaire et d'améliorer les complications observées dans ces modèles caractérisés par une néo-vascularisation défailante.

13636 Ce projet de formation aux procédures expérimentales est destiné aux stagiaires de niveau baccalauréat professionnel, DUT/BTS, Licence, Master et Doctorat et à former des contractuels et des titulaires dans les domaines du diagnostic, de la recherche, du développement et de l'analyse. Ces étudiants sont amenés ensuite à travailler dans le domaine du vivant. Les professionnels qui les recrutent apprécient d'avoir un personnel formé en expérimentation animale. Cette formation est également destinée aux personnels titulaires ou à des CDD.

Les objectifs pédagogiques de cette formation sont doubles et répondent à la réglementation en expérimentation animale en vigueur concernant la maîtrise et le maintien du savoir-faire des expérimentateurs :

- former les expérimentateurs à la mise en œuvre de procédures faiblement invasives (injections intrapéritonéale, intradermique et sous-cutanée), pose de puces télémétriques, gavage et prélèvements sanguins.
- former les expérimentateurs à la maîtrise de leurs procédures expérimentales, au respect du bien-être animal et à l'utilisation du modèle murin dans leurs projets de recherche.

La souris est le modèle le plus utilisé dans la recherche scientifique en général et le plus adapté à la réalisation d'infections expérimentales. L'objectif est donc de mettre 1000 souris à disposition de cette formation, dont les 2/3 seront des souris de réforme et 1/3 des souris d'âges variables en fonction des projets scientifiques à développer.

Remplacement : A la fin de leur stage ou de leur contrat de travail à durée déterminée, les expérimentateurs sont sensibilisés à l'utilisation d'animaux vivants et savent comment réaliser une expérimentation animale dans sa globalité chez la souris. Il est donc nécessaire que leur formation, pour qu'elle soit complète, comporte des manipulations.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de remplacement pour étudier les agents infectieux permettant la formation appropriée de nos expérimentateurs.

Réduction : Utilisation des animaux de réforme issus de l'élevage principalement et des deux sexes indifféremment, soit au total 1000 souris sur 5 ans.

Raffinement :

Avant le début de la formation, les expérimentateurs en formation sont sensibilisés à la préhension/contention des souris, aux procédures à réaliser et au savoir-être afin de limiter le stress des animaux.

Les souris sont acclimatées à leur nouvel environnement pendant une semaine avant la formation en groupe de 3 animaux socialement harmonieux par cage et dans un environnement enrichi (type sopalain, tunnel (à ronger) ou igloo).

13637 Le locus coeruleus (LC) est une structure du cerveau impliquée dans l'excitation, l'attention et la mémoire. La mort des neurones de cette région au cours de vieillissement est un des signes

précoces communs à la Trisomie 21 (T21) et deux autres maladies dégénératives: la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP). Jusqu'à ce jour, les mécanismes qui sont perturbés dans le LC chez les personnes atteintes d'une de ces maladies ne sont pas connus.

Nous proposons ainsi dans ce projet d'étudier le devenir du LC chez les modèles animaux de ces 3 maladies afin de mieux comprendre le lien entre la dégénérescence du LC et l'apparition puis la progression de démence. D'un point de vue pratique, nous allons notamment étudier les capacités de mémoire des animaux ainsi que leur activité quotidienne au cours de l'évolution de la maladie. Nous réaliserons également des injections intracérébrales de vecteur au niveau du LC dans le but de visualiser par la suite, par imagerie, les projections neuronales qui sortent de la structure injectée. Les procédures proposées sont pas ou peu invasives et seront réalisées sous anesthésie dans ce dernier cas.

Ce programme demande d'utiliser un total de 680 souris, sous forme de 3 lots, un par maladie, avec pour 2 d'entre eux un suivi longitudinal permettant d'appliquer le principe de REDUCTION tout en ayant un nombre d'individus que nous estimons nécessaire pour l'obtention des résultats statistiquement significatifs sur la base des études publiées à ce jour. Nous avons pris en compte que des différences liées au sexe pouvaient exister et nous avons choisi d'utiliser les deux sexes dans notre étude.

Afin d'accomplir le principe de raffinement, tout au long de l'expérimentation, nous veillerons à respecter le bien-être animal et éviter tout stress des animaux en mettant en place plusieurs principes tels que l'hébergement des animaux en groupe et l'habituation des souris à l'expérimentateur en manipulant les souris 1 fois par jour, une semaine avant le début des tests comportementaux. Afin de limiter toute souffrance de l'animal, nous administrerons un anti-inflammatoire immédiatement après la chirurgie et 2 fois par jours les 2 jours suivants.

Aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée (l'évaluation de la perte de mémoire, un processus faisant intervenir plusieurs régions du cerveau et plusieurs organes sensoriels en particulier) et qui repose sur l'étude du comportement de l'animal, avec des procédures peu invasives.

13638 Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'efficacité de traitements anti-cancéreux. Or chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose) pouvant être impliqué dans la résistance à ces traitements. Pour étudier les dysbioses de patients chez la souris, nous collectons les selles de patients atteints de cancer afin de réaliser des transplantations fécales chez la souris, qui possèdera alors les bactéries de la flore intestinale des patients. Les souris seront également implantées avec différentes tumeurs puis un traitement anti-cancéreux sera mis en place.

L'objectif de cette étude est de trouver un moyen d'améliorer l'efficacité du traitement anti-cancéreux chez la souris en agissant sur la flore intestinale du patient qui a été transféré chez la souris.

Pour modifier la flore intestinale, nous testerons une supplémentation des souris avec des composants de l'alimentation qui favorise la croissance de bactéries intestinales bénéfiques à notre santé : on appelle ces composants des prébiotiques. Dans cette étude, les pré-biotiques testés seront des sucres appelés glycanes. Nous testerons également une supplémentation en bactéries définies comme bénéfique pour la santé : on parle alors de probiotique.

De plus, nous déterminerons si ces supplémentations en prébiotiques ou probiotiques induisent des effets bénéfiques ou néfastes sur le métabolisme de la souris ou sur le système immunitaire.

Nous avons choisi les glycanes comme prébiotiques car des études cliniques sur des volontaires sains ont mis en évidence un changement de la composition de la flore intestinale suite à l'ingestion de glycanes.

Nous avons choisi d'utiliser certaines bactéries comme probiotiques car ces bactéries permettent la réinduction d'une réponse immunitaire anti-tumorale qui se trouve supprimée par les cellules

cancéreuses. Ainsi, ces bactéries réduisent la croissance tumorale et amplifient l'effet de traitements anti-cancéreux connus pour activer le système immunitaire (immunothérapies).

Par ailleurs, étant donné le nombre élevé d'animaux prévus, il semble important de mentionner dans le RNT que le projet est prévu pour une durée de 3 ans, mais aussi qu'une pré-sélection des prébiotiques à tester est, au préalable, réalisée dans des expériences de cultures de cellules permettant de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, la flore intestinale, le système immunitaire anti-tumorale et l'effet des traitements anti-cancéreux dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire en culture de cellules. Le projet est prévu pour une durée de 3 ans et nécessitera 2808 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons de traitements anti-cancéreux, les différentes supplémentations en prébiotiques et probiotiques et les différents types de tumeurs implantées.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. En effet, une pré-sélection des prébiotiques à tester est, au préalable, réalisée dans des expériences de cultures de cellules permettant de réduire le nombre d'animaux nécessaires. De plus, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie locale ou générale dépendant des gestes techniques.

La contrainte principale pour les animaux sera l'implantation de tumeurs. Ces contraintes seront limitées par un suivi très strict avec application de points limites, limitation des tailles de tumeurs par mesure physique (sous-cutanée) ou au moyen d'imagerie optique de luminescence des animaux (qui permet aussi un suivi longitudinal non invasif plus raffiné).

13639 La maladie de Huntington est une maladie génétique incurable détruisant des cellules de certaines régions du cerveau. Elle entraîne des troubles moteurs et psychiatriques graves et peut conduire à une perte totale d'autonomie et à la mort. Elle touche une personne sur 10 000 en France, ce qui représente environ 6 000 malades.

A ce jour, il n'existe que des traitements pour réduire les symptômes apparaissant généralement vers 40-50 ans, pour soulager la personne malade et ralentir sa dégradation physique et psychologique.

Un modèle de souris génétiquement modifiée peut-être utilisé pour mieux comprendre cette maladie et évaluer de potentiels traitements. En effet, ces souris présentent une dégradation progressive entre 9 et 11 semaines d'âge des fonctions motrices qui récapitule les principaux symptômes de la maladie de Huntington chez l'homme.

Dans le cadre de ce projet, nous allons évaluer une nouvelle molécule, issue d'une phase d'optimisation chimique, et ayant montré un effet très intéressant sur des cultures de cellules utilisées pour étudier les mécanismes de dégénérescence. Il s'agit donc d'une première preuve d'efficacité *in vivo* de ce composé dans le modèle de souris.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes, modèle murin de la maladie de Huntington, sont traitées par une molécule-candidate à différentes doses et étudiées en comparaison à des animaux mutants non traités et des animaux non transgéniques. Des lots de 20 animaux (10 mâles + 10 femelles) par groupe expérimental seront utilisés afin de pouvoir obtenir des résultats robustes et fiables, soit un total de 80 animaux pour le projet.

Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser l'efficacité de la molécule pour corriger les troubles locomoteurs et neuromusculaires.

REMPACEMENT: Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude de molécules sur un gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

REDUCTION: Tous les tests utilisés font partie des tests classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette série de tests permet de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact du traitement sur la progression des symptômes. Du fait de l'utilisation de tests standardisés successivement appliqués sur les mêmes animaux expérimentaux, au cours du traitement et de l'évolution de la pathologie, nous réduisons le nombre d'animaux utilisés.

Nous avons par ailleurs effectué des analyses statistiques permettant de n'utiliser que le nombre d'animaux nécessaire dans chaque test, tout en permettant d'obtenir des résultats fiables.

RAFFINEMENT:

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état de santé des animaux (plus particulièrement au niveau moteur), ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Un enrichissement du milieu sera apporté aux animaux, tels que des matériaux de nidification, du papier déchiqueté, ou encore des tunnels de jeu. Par ailleurs, en raison de l'apparition des symptômes cliniques à partir de 9 semaines d'âge, notamment des problèmes de locomotion, nous ajouterons de la nourriture en gel dans le fond des cages afin que les souris aient accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Enfin, ces animaux seront hébergés par groupe afin de conserver les interactions sociales. Un soin particulier sera apporté au site d'injection, étant donné la répétition du traitement sur la durée du protocole, avec une alternance du site d'injection et un soin local si nécessaire.

13640 La radiothérapie permet de traiter environ 200 000 patients chaque année en France, ce qui représente un patient sur deux atteint de cancer. L'utilisation de rayonnements ionisants (rayons X) pour traiter les tumeurs est très efficace, mais des effets indésirables peuvent survenir à court et à long terme. Comme les protocoles de traitement des cancers s'améliorent, la durée de vie des patients s'allonge, ce qui augmente le risque de voir apparaître des effets indésirables. Ces effets secondaires peuvent altérer durablement la qualité de vie et doivent être pris en compte dans les plans de traitement par radiothérapie. Ils sont causés par l'exposition inévitable des organes et tissus sains (non cancéreux) aux rayonnements, l'irradiation étant délivrée quasiment systématiquement par une source externe. Cette irradiation peut altérer les tissus sains et occasionner, à long terme, des nécroses (destruction) et des fibroses (modification pathologique) d'une partie du tissu ou de l'organe, altérant sa fonction. Parmi les causes de ces dommages, l'altération du réseau vasculaire des organes irradiés ainsi que leur infiltration par les cellules immunitaires, le plus souvent de façon chronique, joue un rôle prépondérant. Nous souhaitons savoir s'il est possible de limiter ces effets indésirables en empêchant les cellules immunitaires de pénétrer dans les tissus irradiés. La paroi interne des vaisseaux sanguins, en contact direct avec le sang, constitue la porte d'entrée des cellules immunitaires dans les tissus lésés. Les cellules qui composent cette paroi interne, les cellules endothéliales, réagissent à l'irradiation et deviennent dysfonctionnelles. Elles sont alors capables d'attirer les cellules immunitaires pour les faire entrer dans le tissu lésé par l'irradiation.

L'objectif de ce projet est de mettre en évidence des mécanismes qui permettent l'entrée des cellules immunitaires (leucocytes) dans les tissus irradiés, ainsi que d'identifier des produits pharmacologiques susceptibles de bloquer l'entrée de ces leucocytes dans les tissus. Par de l'expérimentation *in vitro*, nos travaux ont déjà permis de mettre en évidence un mécanisme possible d'entrée des leucocytes. Les leucocytes s'accrochent à la paroi interne des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire de certaines molécules (des sucres) présents au niveau des cellules de cette paroi en réponse à l'irradiation. Nous avons également identifié des protéines qui jouent un rôle important dans les interactions entre les leucocytes de la circulation sanguine et les cellules endothéliales de la paroi interne des vaisseaux en contact avec le sang (CCR2 et CX3CR1). Pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'infiltration des tissus par les leucocytes, et ce que cela implique au

niveau des lésions tissulaires, nous devons utiliser des modèles expérimentaux précliniques, comme la souris, afin de démontrer les phénomènes à l'échelle de l'organisme entier et de trouver des moyens pharmacologiques de réduire les effets indésirables. Ce protocole constitue la première étape du projet. Il permettra d'identifier la meilleure porte d'entrée des leucocytes (sucre, CCR2 ou CX3CR1). Dans un deuxième temps (projet à venir), il s'agira de tester sur la souris l'effet du blocage de l'entrée des cellules du système immunitaire sur les dommages tissulaires à long terme à l'aide des modèles animaux développés dans le laboratoire. Les retombées possibles de ce projet sont l'identification de moyens thérapeutiques pour limiter les effets secondaires de la radiothérapie et ainsi améliorer à la fois le bénéfice thérapeutique de la radiothérapie et la qualité de vie des patients atteints de cancer.

Pour l'ensemble du projet, le nombre d'animaux (souris mâles âgées de 10 à 12 semaines) maximum utilisé sera de 478 souris C57BL/6J (WT) pour les expériences de blocage de la porte d'entrée des leucocytes par les sucres de la paroi interne des vaisseaux, ainsi que 50 souris C57BL/6J (WT), 50 souris CCR2^{-/-} et 50 souris CX3CR1^{-/-} pour les expériences qui testeront l'importance de CCR2 et de CX3CR1 comme facteurs d'entrée des leucocytes, soit 638 souris au total ; il est demandé un nombre de 650 animaux au maximum pour ce projet pour pallier aux imprévus. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus. Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement est assuré par le fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur.

13641 Le système immunitaire a pour fonction primaire de défendre l'organisme contre des pathogènes extérieurs par différentes mécanismes cellulaires et humoraux. Pour autant, selon les pathologies, le système immunitaire peut être sous-régulé et a besoin d'être stimulé (exemple cancer) ou au contraire peut être d'être suractivé (exemple : transplantation d'organes, maladies auto-immunes) et a besoin d'être contrôlé.

Les patients ayant reçu une transplantation d'organe, bénéficient de traitements immunosuppresseurs qui permettent un certain contrôle du système immunitaire permettant d'éviter le rejet de greffe. Cependant, les traitements présentent des effets secondaires importants chez les receveurs (augmentation du risque de cancer, néphrotoxicité...^o C'est pourquoi, les travaux s'orientent vers une thérapie immunosuppressive plus ciblée.

Parmi les cellules impliquées dans les réponses immunes, les lymphocytes représentent une population importante, elle-même composée de sous-populations. Ces différentes sous-populations de cellules se distinguent les unes des autres par leur fonction et par des marqueurs qui leur sont spécifiques.

Le marqueur CD45RC permet de distinguer les cellules effectrices des cellules régulatrices. En effet, les lymphocytes T (LT) CD4⁺ et LT CD8⁺ exprimant faiblement le marqueur CD45RC ont des propriétés immunosuppressives alors que les cellules exprimant fortement ce marqueur ont un profil pro inflammatoire/effecteur de réponse immune. Notre hypothèse de travail a donc été le développement d'un anticorps anti-CD45RC permettant une immunothérapie ciblant les LT pro inflammatoires/effecteurs qui ont un rôle important dans le rejet de greffe. Dans des études précédentes, nous avons montré que l'anticorps anti-CD45RC induit 1) la mort des cellules LT CD4⁺ et CD8⁺ CD45R^{high} *in vitro*, 2) prévient le rejet de greffe et 3) les réactions de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) chez le rat et chez la souris humanisée.

Dans le but de transférer cette immunothérapie chez l'homme, nous souhaitons étudier la pharmacocinétique et la pharmacodynamique ainsi que le mode d'action de cet anticorps (Ac) dirigé contre le CD45RC humain, dans un modèle d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le macaque, espèce proche de l'homme.

Ce projet se déroulera sur 2 ans, le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 8 macaques pour tester l'anticorps à deux doses différentes.

Dans un souci du respect de la règle des 3R, les animaux testés seront leur propre contrôle, de façon à pallier d'éventuelles variations interindividuelles, ainsi les valeurs d'intradermo-réaction, de

différents paramètres sanguins et biologiques analysés après injection de la molécule d'intérêt seront comparées aux valeurs individuelles avant injection, permettant d'obtenir un maximum d'informations à partir d'un minimum d'animaux. De plus, si les résultats de la dose n°1 de l'anticorps sont satisfaisants, l'anticorps à la dose n°2 ne sera pas testé.

Il n'existe pas de remplacement possible pour ces expérimentations qui répondent cependant aux exigences de réduction et de raffinement.

Bien que nous ayons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés, le modèle primate est indispensable à ce stade de notre étude et ne peut être remplacé par un autre système : effectivement, l'effet de l'anticorps doit être évalué au niveau systémique, le primate correspond au modèle le plus proche de l'homme par son métabolisme, sa physiologie et son système immunitaire.

De façon à diminuer le stress, la souffrance, et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux seront hébergés avant le protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères. De plus, un enrichissement alimentaire, d'activité et d'aménagement des cages spécifiquement à l'espèce, est mis en place de façon compatible à la procédure.

13642 Dans l'hémorragie méningée ou sous-arachnoïdienne (HSA), le taux de mortalité atteint 30% au cours de la première semaine et 50% des patients décèdent au cours des six premiers mois, la principale complication étant une ischémie cérébrale retardée due à une vasoconstriction majeure ou vasospasme associée à des microthromboses cérébrales. Les dommages vasculaires peuvent résulter d'une inflammation vasculaire locale et d'une dérégulation endothéliale, probablement à l'origine d'un pronostic neurologique défavorable pour le patient. Des résultats préliminaires montrent que le peptide vasoactif urotensine II (UII) constitue, chez les patients hémorragiques, un marqueur diagnostique du vasospasme et qu'un ligand du récepteur de l'UII (le récepteur dénommé UT) prévient le vasospasme dans un modèle de souris HSA.

Nos objectifs sont d'étudier l'impact du système urotensinergique sur la cascade d'évènements post-HSA, et en particulier sur le vasospasme cérébral, la mort cellulaire, la neuroinflammation, les modifications endothéliales et les fonctions motrices et cognitives. Pour cela des souris transgéniques seront utilisées, chez lesquelles sera induite une hémorragie méningée : des souris HSA exprimant le récepteur UT de souris, des souris ne possédant pas le récepteur UT (souris sans UT) ou exprimant le récepteur UT humain, et cela à différents délais post-HSA. D'autre part, les effets de ligands urotensinergiques, nouvellement conçus et capables de bloquer les altérations endothéliales et/ou la neuroinflammation, seront évalués chez les souris HSA des différents génotypes, dans le but de proposer de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant le récepteur UT permettant de prévenir les effets retardés post-HSA.

Après la réalisation des opérations chirurgicales (injection de sang dans l'espace sous-arachnoïdien), des études comportementales seront réalisées chez les souris hémorragiques et leurs performances seront comparées à celles de souris contrôles. Six tests comportementaux seront utilisés permettant d'évaluer l'activité spontanée, les comportements de type anxieux et dépressifs, la mémoire et les capacités d'équilibre et de coordination motrice.

De plus, les effets potentiellement protecteurs d'un ligand du récepteur UT (urantide), administré dans l'espace sous-arachnoïdien des souris hémorragiques seront évalués dans ces tests comportementaux. Les effets de 2 autres molécules nouvellement conçues et potentiellement thérapeutiques seront également étudiés.

Le nombre d'animaux est fixé à 16 par groupe pour les évaluations comportementales afin de tenir compte de la variabilité interindividuelle et d'une potentielle mortalité, et de pouvoir réaliser des analyses statistiques. Ces études comportementales seront réalisées à 2 délais post-chirurgie (jour 7 et jour 14) chez les 3 types de lignées de souris : « UTsouris, sansUT et UThumain ».

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans les événements consécutifs à l'hémorragie cérébrale et leur évolution au fil des jours (vasospasme, hydrocéphalie, mort cellulaire, inflammation, dysfonction endothéliale), des études histologiques, biochimiques et de biologie moléculaire seront réalisées à différents délais post-HSA. Afin de réduire le nombre de souris utilisées, les animaux ayant été utilisés lors des évaluations comportementales serviront à réaliser des prélèvements biologiques pour réaliser une partie de ces études.

Pour l'ensemble des études comportementales et biologiques, un total de 5840 souris sera nécessaire pour les 5 ans de projet.

Tout au long du projet, la règle des 3R sera respectée. Pendant les opérations, les souris seront anesthésiées. Une prise en charge de la douleur potentielle sera effectuée. Un suivi quotidien ou bi-quotidien (dans les 48h post-chirurgie) sera effectué par du personnel formé et expérimenté et permettra de détecter un éventuel signe de souffrance. L'hébergement des animaux sera conforme à la réglementation. La mise à mort des souris permettant le prélèvement des échantillons biologiques sera réalisée après anesthésie et en accord avec le cadre réglementaire.

13643 Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre des maladies psychiatriques incluant des troubles psychotiques, la manie, les troubles d'hyperactivité et de déficit attentionnel et l'autisme. Certaines procédures peuvent également s'avérer utiles comme modèles en lien avec les troubles de l'humeur. Les tests décrits dans ce projet sont des tests comportementaux qui permettent de tester l'efficacité d'antipsychotiques. Ces tests sont associés à des troubles psychotiques ou psychiques qui peuvent potentiellement générer du stress chez l'animal. Nous mettons alors tout en oeuvre pour compenser ce stress généré (manipulation fréquente des animaux, mise en place d'enrichissement dans leur hébergement). Les procédures appliquées sont de gravité légère, à l'exception de procédures de catégorie modérée pour laquelle nous devons isoler les animaux (privation de congénères) pour développer des modèles d'autisme et de schizophrénie et pouvoir tester l'efficacité de médicaments.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet ont été caractérisées de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en oeuvre à grande échelle au sein des laboratoires de psychopharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 10200.

Les procédures ne sont pas chirurgicales ; nous ne nous attendons pas à des points limites spécifiques liés aux tests. Un suivi des points limites sera donc réalisé de façon non spécifique (indépendamment du modèle ou de la procédure), permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse pendant sa présence au laboratoire. Ces points limites incluent une surveillance de l'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, l'appétit, le poids, l'état d'hydratation, les tremblements ou convulsions.

13644 A l'intérieur des cellules, les lysosomes représentent le centre de recyclage des déchets. Une nouvelle activité de transport, qui permet de transporter des petites molécules de sucre vers l'intérieur des lysosomes où elles seront entièrement dégradées, avait été mise en évidence il y a quelques années. Ce nouveau type de transport, appelé LOST pour Lysosomal OligoSaccharide Transporter, a été identifié à partir de lysosomes isolés de foies de rat, mais les protéines et les

gènes impliqués ne sont toujours pas connus. Notre but est donc de caractériser les mécanismes cellulaires responsables de cette nouvelle activité de transport.

Le nombre d'animaux utilisés pour l'expérimentation sera en adéquation avec la règle des 3R.

Le Remplacement : Bien qu'une activité de transport LOST existe vraisemblablement dans des lignées de cellules de mammifères qui ont été établies à partir de cellules cancéreuses hépatiques, ces lignées ne sont pas un bon modèle d'étude pour des transporteurs lysosomaux. En effet, les cellules cancéreuses montrent des altérations des lysosomes qui pourraient donc perturber le transport LOST ou affecter ses caractéristiques biochimiques. L'utilisation d'animaux est donc indispensable et notre choix s'est porté sur les rats car c'est chez cette espèce que ce transporteur lysosomal a été découvert.

La Réduction : Afin d'affiner les caractéristiques de ce transporteur lysosomal, 3 stratégies complémentaires seront abordées successivement qui permettront une meilleure caractérisation de certains paramètres biochimiques, la mise au point d'un dosage de transport LOST fluorescent, et la purification des protéines impliquées dans ce transport. Pour chaque stratégie, le matériel biologique d'expérimentation sera toujours des lysosomes purifiés à partir de foies de rats et un foie de rat prélevé chaque semaine permet d'isoler suffisamment de lysosomes pour effectuer une trentaine de conditions expérimentales de transport LOST. Pour ce projet, qui se déroulera sur 4 ans de recherche (11 mois d'expérimentation par an x 4 ans x 4 semaines), 176 rats seront alors nécessaires. Le foie des rats, mis préalablement 16 heures à jeun, sera prélevé sous anesthésie générale, puis les animaux seront euthanasiés.

Le Raffinement : Une attention toute particulière sera portée sur le bien-être des animaux pendant la stabulation des animaux dans l'animalerie conventionnelle, par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie et qui appliquera les points limites habituels de l'animalerie. Lorsqu'un animal doit entrer dans la procédure, il est pesé préalablement à la mise à jeun puis placé seul dans une cage. Le lendemain matin, le bien-être de l'animal sera évalué selon une grille d'évaluation qui repose sur le poids corporel, l'apparence physique et le comportement.

13645 La brique élémentaire du muscle squelettique est la fibre musculaire, issue de la fusion de centaines de cellules spécialisées, les myoblastes. Ces fibres musculaires dites « squelettiques » s'associent entre elles par milliers afin de former les muscles squelettiques responsables de tous les mouvements volontaires. Dans chaque fibre musculaire, le positionnement des noyaux est finement régulé, particulièrement au niveau de la jonction neuromusculaire, le lien entre le muscle et le motoneurone, qui permet tous les mouvements volontaires. Cette organisation des noyaux dans les fibres est pressentie comme responsable de l'intégrité fonctionnelle de la fibre musculaire. Le défaut de positionnement précis de ces noyaux dans les fibres musculaires matures (agrégation) a récemment émergé comme un potentiel facteur contribuant à certaines maladies musculaires: il est ainsi fortement corrélé à certaines myopathies et à des faiblesses musculaires. Notre équipe cherche à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des localisations nucléaires dans les fibres musculaires et leur implication dans la fonctionnalité des muscles.

Un criblage sur un modèle de fibres musculaires formées *in vitro* a permis d'identifier des protéines régulant la formation des domaines nucléaires dans les fibres. Cette approche a permis d'identifier des modifications qui altèrent fortement la localisation nucléaire dans les fibres musculaires formées *in vitro*.

Des modèles de souris génétiquement modifiées n'exprimant plus ces protéines dans les fibres musculaires ont été générées. Nous souhaitons maintenant mesurer par une procédure de stimulation sur animal anesthésié, si nos modèles présentent une perte de force/fatigabilité musculaire.

Ce projet s'appuie sur une procédure expérimentale et mobilisera un total de 450 souris.

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

Remplacement: Le modèle murin reste l'unique moyen d'une part pour étudier fonctionnellement le muscle dans son entité et d'autre part pour évaluer l'impact des défauts d'expression de notre protéine d'intérêt sur le fonctionnement musculaire au niveau de l'organisme.

Réduction du nombre d'animaux: le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum grâce aux expériences passées de l'équipe sur les analyses statistiques combinées aux données de la littérature. Les animaux seront par la suite et ce afin de limiter l'utilisation de nouveaux animaux, utilisés pour des études histologiques et de cultures cellulaires pour plusieurs analyses. Des prélèvements multiples seront réalisés après mise à mort sur le même individu pour des tests parallèles.

Réduction de la douleur, souffrance, raffinement: Les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles seront privilégiés. Plus particulièrement, la procédure expérimentale utilisée n'engendre pas de douleur nécessitant la mise en place d'un traitement analgésique. Aussi, des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Des fibres de peuplier ainsi que du coton seront placés dans les cages d'hébergement pour favoriser la nidification des souris et leur bien-être. Pour limiter au maximum la douleur sans remettre en cause les résultats, les procédures seront réalisées selon un ordre précis : après anesthésiés par inhalation d'un mélange gazeux, le muscle gastrocnémien sera stimulé électriquement (à différents niveaux d'intensité), de manière totalement non-invasive.

13646 Les modèles animaux de cancer humain et murin demeurent des éléments critiques dans la compréhension de la physiopathologie du cancer, l'identification de nouvelles cibles et de nouveaux candidats médicaments et la compréhension des mécanismes de résistance. Le modèle d'injection de cellules en sous-cutanée permet d'examiner de larges cohortes de tumeurs dont la croissance et la réponse aux médicaments peuvent facilement être évaluées en particulier par la possibilité de suivre la cinétique de croissance de la tumeur par des mesures au pied à coulisse.

Malgré que la greffe de cellules ou de tissu cancéreux réalisée sur un site ne correspondant pas à celui de la tumeur d'origine, ce type de modèle a pu montrer un caractère prédictif satisfaisant de l'activité de molécules thérapeutiques comparable aux réponses obtenues en clinique humaine, qui en fait un modèle standard de la recherche en oncologie.

La procédure décrite dans ce projet correspond à la création de différents modèles de tumeurs chez le rongeur. L'objectif de ce projet est de créer différents types de tumeurs chez la souris ou le rat, après administration de cellules tumorales, de mesurer différents critères (taille de la tumeur, survie), et de tester l'efficacité ou la toxicité de molécules aux propriétés anticancéreuses décrites ou potentielles.

La création de ce type de modèle dans ce projet ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car l'induction de tumeur s'accompagne de modifications physiopathologiques et de la création du microenvironnement spécifiques ne pouvant actuellement pas être reproduites *in vitro*, ces modifications étant nécessaires pour l'étude d'efficacité d'anticancéreux.

L'utilisation de la souris ou du rat comme espèce hôte se justifie par le fait que ces espèces développent rapidement des tumeurs après injection de cellules tumorales et qu'il s'agit des espèces les mieux décrites dans la littérature.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test sera optimisé de façon à permettre une interprétation correcte des résultats en se basant sur une analyse de puissance suffisante pour les tests statistiques à appliquer, limitant ainsi une répétition du test.

Le projet consistera à développer différents modèles puis de tester des molécules de référence connu pour avoir une activité anti-cancéreuse mais aussi des molécules non encore décrites. Le développement consistera à définir un nombre suffisant de cellules pour générer une tumeur chez l'animal. Dans ce cadre, 3 à 4 concentrations de cellules seront testées avec un minimum de 3 animaux par groupe. Dans un second temps, un effectif de 6 à 14 animaux par groupe sera utilisé pour évaluer l'efficacité et la toxicité de molécules. Un test comportera minimum trois groupes (un contrôle, un anticancéreux de référence, et au minimum une dose de substance test), soit un minimum de 18 animaux par test. Ainsi en se basant sur une soixantaine de modèles à développer

et tester au courant de ce projet, nous estimons à 1620 le nombre d'animaux qui seront utilisés par an (i. e. 4860 sur trois ans de projet).

Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale est mis en œuvre grâce à l'utilisation de points limites clairement établis (incluant une surveillance de l'aspect général, un suivi de poids...), permettant d'euthanasier tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Le programme d'anesthésie et d'analgésie est défini par un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. De la même manière, lorsque les protocoles l'exigent, les chirurgies sont raffinées au maximum, en mettant à disposition des animaux, de l'oxygène à concentration ajustable et des tapis chauffants. Aussi, il est mis en place un enrichissement complet dans leur hébergement, sous la forme de jouets, litière, objet de nidification, objet à ronger ou mastiquer, présence de congénère....

13647 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, se caractérisent par l'inflammation de la paroi du tube digestif, liée à une hyperactivité du système immunitaire. Elles se manifestent par des diarrhées et des douleurs abdominales, et pour 20% des patients, des lésions sévères du tube digestif, un état de fatigue, de l'anorexie et de la fièvre, nécessitant une hospitalisation. Elles affectent plus de 0.3% de la population mondiale et leur incidence est en constante augmentation. Les aminosalicylés, corticoïdes et immunosuppresseurs sont efficaces contre les formes modérées de la maladie mais pas très bien tolérés. Les immunomodulateurs (anti-TNF, anti-IL-12/23) sont plus efficaces mais tendent à perdre leur efficacité après quelques années. Il est donc urgent de développer des traitements plus efficaces et mieux tolérés. Les procédures qui constituent ce projet s'inscrivent dans le cadre du développement de traitements innovants dans le domaine des MICI. Elles nécessiteront l'utilisation de rongeurs pour démontrer l'efficacité des composés et déterminer les doses qui seront administrées chez le patient. Les procédures consisteront à mettre en place et à utiliser des modèles standards bien décrits dans la littérature. Il n'existe pas à ce jour de méthodes dites alternatives qui puissent reproduire la complexité des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de ces maladies chroniques. Le recours à l'animal de laboratoire permettra le développement de nouveaux traitements visant à améliorer la qualité de vie de millions de patients sévèrement affectés par les maladies chroniques intestinales.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Des animaux de laboratoires doivent être utilisés parce qu'à notre connaissance, il n'existe pas de modèles *in silico* ou *in vitro* qui reproduisent l'extrême complexité des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, celles-ci pouvant impliquer de nombreux tissus et organes, et pour lesquelles les mécanismes biologiques sous-jacents sont encore très largement incompris. Seul un modèle animal peut reproduire les interactions de ces systèmes biologiques complexes qui sont nécessaires pour évaluer l'efficacité des nouveaux traitements.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera déterminé à partir de données issues d'études similaires rapportées dans la littérature. Des analyses de puissance statistique seront utilisées sur les données des premières études de mise en place des modèles pour déterminer si le nombre d'animaux par lot puisse encore être réduit.

Raffinement :

Les animaux seront hébergés dans des locaux conformes aux standards réglementaires. Ils seront groupés dans des cages contenant de l'enrichissement et des matériaux spécialisés pour faciliter la nidification. Les procédures jugées douloureuses ou constituant une source d'inconfort ou de stress se feront sous anesthésie gazeuse de courte durée. Les animaux feront l'objet d'une surveillance clinique journalière sur la durée de l'étude. La consigne TLSE-CEPAL-CON 009 relative aux points limites en expérimentation animale sera suivie en cas de complications. Des soins adaptés seront donnés aux animaux affectés, par ou sous autorité du vétérinaire ou euthanasiés selon les critères définis dans la consigne.

Le projet nécessitera un maximum de 12 500 rongeurs, soit 2 500 par an pendant 5 ans.

13648 Aujourd'hui, l'utilisation des cannabinoïdes pour le traitement des maladies neurologiques suscite beaucoup d'intérêt. Cependant, la littérature scientifique concernant la maladie de Parkinson (MP), une des maladies neurologiques les plus fréquentes, fait état de résultats incomplets et contradictoires liés à la disparité des molécules, des dosages et des modes d'administration des cannabinoïdes. Le système endocannabinoïde étant largement représenté au sein des ganglions de la base (ensemble de structures cérébrales impliquées dans la motricité et dont les neurones sont sensibles à la dopamine), la plupart des études concernant la MP se sont intéressées aux interactions cellulaires et moléculaires entre cannabinoïdes et dopamine. Cependant, l'efficacité clinique des cannabinoïdes sur les symptômes de la MP restent encore peu étudiés. Actuellement, les effets observés chez l'animal comme chez l'Homme concernent la motricité, le fonctionnement intellectuel, l'humeur et la douleur. L'effet thérapeutique du cannabis est d'ailleurs déjà expérimenté par certains patients. Mais, si les cannabinoïdes ont le potentiel d'être bénéfiques concernant certains symptômes de la MP dans plusieurs modèles animaux, le traitement optimal reste à identifier. Il semble donc urgent de proposer des études apportant des informations d'une part sur les effets moteurs, mais aussi non moteurs de l'inhalation de cannabinoïdes et d'autre part sur le lien dose/concentration/effet de tétrahydrocannabinol (THC) et de cannabidiol (CBD) chez un modèle rat de la MP dans un premier temps. Nous focaliserons notre intérêt sur ces deux molécules puisqu'elles constituent les 2 composés principaux du cannabis. En effet, le THC est la principale molécule active du cannabis. Elle possède des propriétés psychoactives. Le CBD, quant à lui, n'est pas une substance psychotrope. Il permet de moduler certains effets du THC (de les potentialiser comme pour l'analgésie par exemple). Il est important d'étudier à la fois l'action de ces 2 molécules seules mais également d'étudier les effets du mélange THC/CBD sur les symptômes de la MP.

Notre équipe utilise une approche translationnelle, des rongeurs aux patients parkinsoniens afin de répondre à cette problématique et apporter des données concrètes quant aux effets des cannabinoïdes sur les symptômes moteurs et non moteurs de la MP et d'étudier les conséquences comportementales de l'utilisation du cannabis (CBD+THC).

Plusieurs questions seront posées. Tout d'abord, nous étudierons les effets du THC, du CBD et d'un mélange THC+CBD dans des tests moteurs basiques (catalepsie induite par l'haloperidol, activité locomotrice spontanée). Puis, l'identification du mélange optimal (THC+CBD) comme traitement dans la maladie de parkinson sera expérimenté chez un modèle rongeur (rat) de la MP. Dans un 2ème temps, il faudra déterminer le mode d'administration (aigu ou chronique) des cannabinoïdes.

Enfin, la partie pharmacologique du projet s'attachera à étudier quelle activité spécifique des récepteurs aux cannabinoïdes (CB) est la plus efficace, puis nous comparerons les effets de la manipulation des récepteurs CB1 et CB2. Nous étudierons les effets des agonistes et des antagonistes des récepteurs CB1 et CB2 sur le comportement moteur, l'attention, l'impulsivité, les comportements de persévérance ainsi que les processus motivationnels chez des rats contrôles et des rats 6OHDA, modèle de la maladie de MP.

De plus, les patients parkinsoniens souffrent de douleurs chroniques. C'est un aspect qui a été longtemps sous-estimé dans le contexte de la MP, mais qui est très important. Compte tenu des interactions CBD/THC dans la prise en charge de l'analgésie, la contribution d'un tel mélange à réduire ces douleurs doit être étudié. Ainsi, dans la dernière partie du projet, nous testerons les effets du THC seul, du CBD seul et d'un mélange THC/CBD sur la douleur dans le cadre de la MP.

Les comportements cités ci-dessus résultent de l'interaction de différents systèmes cellulaires au niveau de différents ensembles de réseau neuronaux. Leur étude requiert de ce fait un modèle intégré et non uniquement cellulaire. De plus, le cerveau du rongeur duplique de façon assez similaire les structures qui sont affectées dans la maladie de parkinson chez l'Homme. L'utilisation du rat est donc nécessaire pour les études neuropharmacologiques et comportementales qui

nécessitent un organisme entier avec une mise en place de structures cérébrales complexes et interconnectées.

Au total, 224 rats seront nécessaires pour réaliser l'intégralité de ce projet. Chaque étude comportant plusieurs sous-groupes, il faut un nombre de rat minimum important pour que toutes les comparaisons souhaitées puissent être réalisées (n=8 par sous-groupe). Tout au long des expérimentations, les rats seront hébergés par 2 à l'animalerie et bénéficieront d'enrichissement dans leur cage afin de réduire leur stress. Concernant les procédures invasives, les douleurs post-chirurgie ainsi que les douleurs liées à la dernière partie du projet seront traitées immédiatement grâce à l'administration d'analgésiques. Enfin, les animaux seront surveillés quotidiennement afin d'anticiper l'apparition de symptômes moteurs ou de signes de souffrance et de les prendre en charge immédiatement. Toutes les chirurgies seront réalisées sous anesthésie et analgésie appropriées.

13649 L'ischémie, diminution d'apport sanguin artériel à un organe, est une cause majeure de réduction d'apport en oxygène aux tissus chez l'adulte. Nous faisons l'hypothèse que l'ischémie pancréatique est impliquée dans le développement et l'aggravation des altérations de la sécrétion d'insuline et donc dans le développement du diabète.

En premier lieu, nous souhaitons développer deux modèles murins : 1/ un modèle de souris présentant une ischémie pancréatique chronique suite à une ligature de l'artère principale irrigant le pancréas, 2/ un modèle d'hypertension provoqué par la mise en place chirurgicale de pompe de diffusion de vasodilatateur sous la peau. Dans ces différents modèles, nous étudierons divers paramètres biologiques tels que le métabolisme du glucose (test de tolérance à l'insuline et au glucose), nous quantifierons les anomalies vasculaires, la différenciation des cellules Bêta produisant l'insuline et la dégénérescence générale du pancréas. Nous étudierons en particulier comment les cellules du pancréas qui sécrètent l'insuline répondent à ce manque d'oxygène, à la fois dans leur fonction de sécréter l'insuline mais aussi comment elles tentent de rétablir une circulation sanguine suffisante par la sécrétion de facteurs proangiogéniques. Ces observations serviront de base pour déterminer les cibles d'éventuelles interventions pharmacologiques.

Le nombre de souris utilisées sera de 60. Nous cherchons ainsi à valider *in vivo* des mécanismes cellulaires préalablement identifiés par des études *in vitro*.

Des études sur l'hypoxie des cellules Bêta ont déjà été réalisées *in vitro*, mais les effets d'une ischémie pancréatique *in vivo* sont mal connus. L'expérimentation animale sur souris est, à ce stade de la recherche, le seul modèle disponible pertinent. L'ischémie pancréatique en conditions réelles sur nos souris permettra de mesurer la physiologie du glucose et d'étudier le comportement *in vivo* du pancréas dans sa globalité.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum (60). Les conditions d'hébergement, de soins ainsi que les méthodes utilisées seront en ligne avec les recommandations actuelles afin de réduire au maximum souffrance, douleur, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les procédures comporteront des gestes de chirurgie limitée (pose de cathéter veineux, laparotomie, extériorisation du pancréas), et seront réalisées par des chirurgiens confirmés. La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie et avec analgésie au décours pour maîtriser la douleur, l'état général de l'animal sera très régulièrement suivi et évalué par des échelles standardisées afin de surveiller à tout instant l'animal pour privilégier son confort.

De plus, des points limites ont été établis, entraînant l'arrêt systématique de la procédure et la mise à mort anticipée de l'animal à chaque étape des expérimentations si nécessaire.

A terme, si nos travaux confirment que l'ischémie est une cause de déficit de sécrétion d'insuline et de différenciation des cellules Bêta, ils permettront d'envisager d'une nouvelle manière le Diabète de Type 2. Nous pourrions alors envisager la correction de ces désordres par une thérapie ciblée sur les vaisseaux chez les patients diabétiques.

13650 L'intestin est un organe complexe qui met en jeu des interactions entre le microbiote, les cellules de l'épithélium et le système immunitaire. Les maladies inflammatoires chroniques du système digestif (MICI) comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse ont une incidence en hausse dans les pays industrialisés. Ces MICI sont liées à une inflammation de la paroi du tube digestif provoquée par une hyperstimulation du système immunitaire digestif. Les causes de l'inflammation, probablement multiples et mettant en jeu des facteurs génétiques, auto-immuns et environnementaux, restent inconnues. Des altérations de la composition du microbiote intestinal semblent clairement jouer un rôle dans l'initiation et le développement de l'inflammation mais les processus mis en jeu sont mal compris.

Pour exercer ses fonctions de réabsorption et de digestion des nutriments, il est important que l'intestin soit en mesure de propulser son contenu de façon optimale. La motilité intestinale est donc un processus très précisément régulé. Des dysfonctionnements de la motilité intestinale ont été observés chez des patients atteints de MICI, mais les mécanismes pathologiques mis en jeu sont mal connus. L'objet principal de ce projet est d'évaluer *in vivo* la motilité intestinale par échographie dans des modèles de souris transgéniques dans lesquels une altération du microbiote et une inflammation chronique sont présents. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes conduisant à des perturbations de la motilité intestinale dans des contextes d'inflammation chronique.

Pour ce projet, nous utiliserons 80 souris, sur une durée totale de projet de 5 années. Notre démarche s'inscrit dans le respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 (« règle des 3R »). Remplacement: Des modèles *in vitro* ont été mis en oeuvre en amont du projet afin de ne poursuivre des expérimentations *in vivo* uniquement sur des cibles thérapeutiques ayant déjà démontré un intérêt *in vitro*. Afin de réduire le nombre d'animaux, le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et les élevages seront utilisés au mieux puisque les études seront menées sur des mâles et femelles, et la majorité des génotypes produits seront utilisés. Par ailleurs, l'échographie est une technique non invasive qui présente l'avantage de pouvoir étudier une cohorte d'animaux en fonction de l'évolution de la maladie, permettant également de réduire le nombre d'animaux. Les animaux feront l'objet d'une surveillance régulière par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Afin de réduire au maximum la douleur et l'angoisse que certains protocoles pourraient engendrer chez les animaux, des points limites ont été définis. Tous les animaux auront à leur disposition de la boisson et de la nourriture à volonté, et leur milieu sera enrichi à l'aide de carrés de coton pour la construction d'un nid, ainsi que de litière mélangée à des copeaux.

13651 Les poissons petits pélagiques représentent à la fois des espèces clés de voûte de l'écosystème de par leur place centrale dans le réseau trophique mais aussi un enjeu économique très important pour les pêcheries méditerranéennes. Depuis 2008, les stocks de sardines (*Sardina pilchardus*) du Golfe du Lion ont subi des changements drastiques avec une perte de biomasse et une évolution brutale dans la structure en âge et en taille de la population, entraînant une diminution très nette des captures françaises. Cette diminution de la biomasse résulterait d'une baisse conjointe de la croissance et de la condition corporelle des sardines, et non d'une baisse du nombre de poissons. Ce changement semble pointer vers un défaut de prise énergétique et donc d'alimentation, qui se traduirait par une surmortalité préférentielle des classes d'âges les plus élevées. Cette surmortalité ne semble liée ni à la pêche, ni à une pression de prédation importante que ce soit de la part des thons rouges ou des mammifères marins. Il en résulte que le stock de sardines du Golfe du Lion est maintenant reconnu en déséquilibre écologique. Le présent projet vise à mieux comprendre, avec des expérimentations en conditions contrôlées, les relations entre l'état nutritionnel des sardines, leur condition corporelle, et leur performance de nage. Ces informations devraient permettre d'évaluer si la condition des animaux sauvages s'approche d'un état de privation alimentaire à certaines périodes de l'année, avec des retombées sur la capacité de fonctionner normalement dans le milieu. Le projet impliquera des mesures d'échanges gazeux, par respirométrie sur des groupes de sardines en bassin, pour identifier et suivre les 'trois phases' de

l'état nutritionnel. Ces phases sont : lors d'une alimentation (phase I), à jeun (phase II) et en privation (phase III). Des mesures en parallèle, de la condition corporelle des individus au sein des groupes, permettront d'identifier les seuils de la condition qui indiqueraient la transition des sardines d'une phase à l'autre. En particulier, entre la phase II, un état de jeûne prolongée où leurs réserves lipidiques fournissent l'énergie, et la phase III, un état de véritable privation. Dans la phase III, les réserves lipidiques sont épuisées, l'animal doit consommer ses propres tissus corporels pour répondre à ses besoins énergétiques, et sa survie est fortement menacée. Les effets du jeûne et de la privation sur la physiologie seront évalués avec des mesures de la performance de la réponse de fuite ('C-start escape response') d'individus, par le biais de vidéo à haute vitesse. Cette réponse réflexe est utilisée pour échapper aux prédateurs et, chez les poissons, la performance est réduite suite à un jeûne prolongé et/ou une période de privation.

Les protocoles considèrent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner):

- Remplacer: Ces études, qui impliquent la mesure des échanges gazeux et des réponses de fuites *in vivo*, doivent être réalisées sur des animaux.

- Réduire: Le nombre d'individus utilisé (n = 200 animaux) permettra la création de 10 lots de 20 poissons dans chaque bassin pour la respirométrie. Ce nombre permettra un comportement social 'de banc' dans les bassins avec une biomasse suffisante pour mesurer avec précision les échanges gazeux dans le volume d'eau du bassin. Le nombre de bassins (n = 10) est le minimum nécessaire afin de permettre des tests statistiques appropriés aux objectifs.

- Raffiner: Les protocoles d'analyse des échanges gazeux dans les bassins qui abritent les poissons, et des réponses de fuite des individus dans une arène expérimentale, sont bien établis chez les poissons. L'objectif des protocoles est de limiter au minimum la souffrance et le stress des animaux, avec protection des poissons de toute nuisance visuelle et sonore pendant les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de stress ou d'agitation de l'animal. Les poissons sauvages peuvent supporter des périodes de jeûne prolongées en nature, stochastiques ou en relation avec les saisons. La privation est connue comme étant l'une des sources majeures de mortalité chez les populations de poissons. Cependant, une procédure expérimentale de privation des poissons est classée sévère et demande une dérogation des conditions normales d'hébergement. La justification est que l'application de cette procédure, sur un nombre limité d'individus en captivité, va permettre une avancée importante dans la capacité d'interpréter les implications écologiques de la mauvaise condition corporelle chez les populations sauvages, vers une gestion durable des stocks de sardines en Méditerranée.

13652 La microcirculation est la composante du système circulatoire qui correspond aux plus petits vaisseaux sanguins, situés au sein des organes ; elle est composée des artérioles terminales, de capillaires et de veinules. La microcirculation est un système complexe et essentiel au bon fonctionnement des organes, puisqu'elle permet l'apport d'oxygène et de métabolites aux cellules parenchymateuses, elle contraste avec la macrocirculation qui est responsable de l'apport sanguin vers et depuis les organes.

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

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

comme l'insuffisance cardiaque, les états de chocs de diverses origines et la phase post-opératoire de chirurgies majeures.

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

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

Ce projet, dont la durée est évaluée à 5 ans, repose sur l'utilisation de modèles porcins anesthésiés, qui permettent de reproduire des conditions pathologiques similaires à l'homme, et dont le gabarit permet l'utilisation de dispositifs médicaux adaptés à l'usage humain, en particuliers pour la surveillance des paramètres macro et microcirculatoires. Il n'existe à ce jour aucun modèle alternatif permettant d'évaluer la microcirculation, en particulier dans des contextes pathologiques. Un maximum de 150 cochons est envisagé sur 5 ans, le nombre d'animaux pour chaque partie du projet étant restreint au nombre minimum permettant la réalisation de test statistique afin de pouvoir interpréter les résultats. Il s'agit de protocoles dits "sans réveil". Les animaux sont maintenus sous anesthésie générale tout au long du protocole et ne sont pas réveillés. Le protocole prévoit une analgésie puissante tout au long de l'expérience. Les dommages et souffrances éprouvés consciemment par l'animal sont donc très limités.

13653 Le rôle du système immunitaire dans l'évolution clinique des cancers est de plus en plus décrit dans la littérature scientifique. On parle de surveillance et de contrôle immunologique de la tumeur dans le cas des cancers solides (ex : mélanome, cancer du poumon). Au cours des dernières années, on a découvert l'implication de différents facteurs dans le maintien d'une bonne réponse immunitaire dans un contexte tumoral, notamment l'implication du microbiote intestinal. L'intestin constitue l'une des plus grandes sources de cellules immunitaires de l'organisme du fait de sa grande surface d'exposition avec le milieu extérieur (aliments, virus et bactéries...). Une composition défavorable de la flore intestinale ainsi que l'utilisation d'antibiotiques altérant cette flore entraînent une progression plus rapide des maladies cancéreuses et limitent l'efficacité des traitements antitumoraux.

Ces observations nous laissent supposer le rôle fort du système immunitaire intestinal dans la réponse aux traitements antitumoraux.

Les récentes immunothérapies, qui déclenchent une réponse ciblée du système immunitaire contre la tumeur, ont conduit à une amélioration significative dans le traitement de nombreux types de cancers, comme le mélanome ou le cancer du poumon.

Toutefois, le taux de réponse global aux immunothérapies n'est pas optimal. Par exemple, dans le cas du Nivolumab, une immunothérapie ciblant le point de contrôle immunitaire « PD1 » (protéine de mort cellulaire programmée transmembranaire 1), seulement 20% des patients traités répondent

au traitement. Comprendre comment le système immunitaire intestinal interfère avec ces thérapies semble donc essentiel.

D'un point de vue mécanistique, on ne connaît pas encore le lien moléculaire et cellulaire entre le système immunitaire intestinal et l'immunité antitumorale extra intestinale.

Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, telle que la maladie de Crohn, les protéines CCL25 et MadCAM1 sont d'importants messagers intestinaux spécifiques qui dirigent les cellules immunitaires dans l'intestin et les y maintiennent. Les tumeurs et leurs vaisseaux peuvent produire localement le CCL25 et exprimer le MadCAM1. Ces molécules de signalisation pourraient donc attirer les cellules immunitaires de l'intestin vers la tumeur.

Dans le modèle de souris Kaede que nous utilisons, les cellules immunitaires peuvent être marquées dans l'intestin afin de suivre leur migration vers la tumeur. Celles-ci peuvent ensuite être classées en fonction de leurs molécules de surface en cellules immunitaires qui ralentissent ou accélèrent la croissance tumorale. Nous pouvons également voir si ces cellules immunitaires reconnaissent les protéines CCL25 et MadCAM1.

Les questions suivantes se posent :

- 1) Quelles cellules immunitaires migrent de l'intestin vers la tumeur et inversement ?
- 2) Quelles sont leurs contributions dans la réponse au traitement antitumoral (sont-elles bénéfiques ou nuisibles pour la réponse au traitement) ?
- 3) La migration de ces cellules immunitaires est-elle influencée par les antibiotiques, la flore intestinale ou la thérapie antitumorale elle-même ? Certains antibiotiques sont-ils plus sûrs à utiliser que d'autres dans un contexte de cancer ?
- 4) Les cascades de transduction de signaux incriminés peuvent-elles être modifiées dans l'intérêt du patient (par exemple en les bloquant) ?

Malheureusement, il n'est pas possible de suivre la migration des cellules de l'intestin à la tumeur chez l'homme. En général, il n'y a pas non plus de biopsie intestinale faite chez les patients atteints de cancer solides (à l'exception du cancer colorectal).

C'est pourquoi, pour développer le concept de base de la migration des cellules immunitaires de l'intestin vers la tumeur et inversement, nous avons besoin de modèles animaux qui nous permettent de mettre en évidence physiquement et biologiquement cette migration. Ces modèles animaux doivent nous permettre en même temps d'explorer des défauts dans la sécrétion des protéines intestinales impliquées dans les fonctions immunitaires, dans un contexte tumoral et de déséquilibre de la flore intestinale par la prise d'antibiotiques.

En parallèle à cette exploration *in vivo* chez la souris, nous effectuons une étude clinique chez l'homme dans le cadre de laquelle nous analysons des échantillons de tissu du côlon et d'intestin grêle de patients atteints de cancer qui, pour d'autres raisons, doivent subir une coloscopie. Cela nous permet de transposer et valider les résultats biologiques obtenus chez la souris à l'homme.

Ce projet nécessitera plusieurs expérimentations et expérimentateurs. Le projet est prévu pour une durée de 2 ans et nécessitera 1240 souris. Ce nombre d'animaux se justifie par la diversité des modèles de tumeurs que nous utilisons pour pouvoir extrapoler le mécanisme dans des contextes tumoraux différents, du nombre de fèces de patients que nous utilisons pour transférer la flore des patients aux souris et étudier son rôle dans ce mécanisme, et les différentes voies de signalisation étudiées.

Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, physiologiquement proche de l'homme, porteur de tumeur). D'autre part, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables pour valider notre découverte. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (un anesthésiant local sera appliqué à chaque injection). Ces animaux recevront une attention particulière post acte chirurgical pour détecter tout inconfort lié à l'intervention. Des mesures d'enrichissement de

l'environnement de ces souris sont prises pour améliorer leur confort, telle que la mise en place d'éléments permettant la construction d'un nid, pour reproduire leurs conditions de vie naturelle (endroit chaud et confortable) et un accès non limité à de la nourriture et de l'eau.

13654 La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est un traitement qui consiste à collecter des cellules immunitaires du sang d'un patient, à les photoirradier par rayons ultraviolets puis à les réinjecter au patient lui-même. Ce traitement est très utilisé dans certaines maladies cancéreuses et de nombreuses maladies immunitaires, toutes sévères. Ce traitement est de plus en plus utilisé et le nombre de séances et de patients traités a été multiplié par 10 durant les 10 dernières années. Malgré cet usage intensif, les mécanismes d'action de la PCE ne sont assez pas connus et cela gêne fortement l'optimisation d'utilisation de ce traitement qui est contraignant, coûteux, non dénué d'effets secondaires et dont l'efficacité n'est pas prévisible avant plusieurs mois de traitement. Il apparaît donc nécessaire de mieux connaître les mécanismes d'action de la PCE.

Il est impossible d'étudier ces mécanismes d'action chez l'homme pour de nombreuses raisons :

- il existe plusieurs étapes dans la réponse immunitaire induite par la PCE,
- il existe de multiples types de cellules impliquées et de multiples voies immunitaires qui sont déclenchées après un traitement par PCE
- ces différentes voies varient avec les histoires antérieures et les traitements des patients (patients ayant reçu une greffe de moelle, une greffe d'organe, ayant un taux normal ou peu de globules sanguins, prenant un ou plusieurs traitements immunosuppresseurs ou par cortisone).

Par conséquent il nous apparaît indispensable d'étudier les modifications immunitaires induites par la PCE dans un modèle animal dont les mécanismes immunologiques ne varient pas comme chez l'homme, sont bien connus et dans lequel la réponse immunitaire peut être suivie dans la rate ou les ganglions, ce qui est le cas de la réaction d'hypersensibilité de contact. De plus nous avons besoin de l'animal en entier et de son système immunitaire dans sa globalité pour que la totalité de la réponse immunitaire de la PCE puisse être générée et que l'on puisse analyser tous ses effets.

Le modèle animal choisi est le modèle de l'hypersensibilité de contact qui est l'équivalent d'un eczéma transitoire de la peau, qui peut facilement provoquer chez la souris. La PCE empêche cette réaction anormale d'hypersensibilité de contact car elle génère des cellules suppressives, qui empêchent le développement de cette réaction anormale.

Notre but est caractériser certaines propriétés de ces cellules suppressives ainsi que leurs mécanismes d'action. Ceci apportera des pistes permettant de mieux prédire les meilleures conditions immunitaires susceptibles d'optimiser le traitement et la prise en charge médicale de patients porteurs d'affections sévères.

Notre 1er objectif est de prélever les cellules suppressives au sein de la rate des animaux traités par PCE. Puis nous les cultiverons (dans des éprouvettes appropriées) avec d'autres cellules de l'immunité pour analyser leur influence sur ces cellules de l'immunité.

Notre 2ème objectif est d'abolir l'effet suspecté des cellules suppressives en injectant par voie sous cutanée des agents bloquant cet effet, chez des souris préalablement traitées par PCE et chez lesquelles une hypersensibilité cutanée de contact a été induite. Ceci permettra de vérifier que l'effet suspecté est bien un mécanisme d'action majeur de la PCE.

Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le plus adapté pour le développement de modèles immunologiques. Les expériences ont été conçues dans le respect des animaux et en accord avec le principe de la démarche "3R" (réduction, raffinement et remplacement).

- Le nombre d'animaux est réduit en ne répétant que les expériences et les contrôles strictement nécessaires, en privilégiant des expériences utilisant le minimum de souris (réduction) et en privilégiant des expérimentations *in vitro* (en dehors de l'animal) suite aux expérimentations chez l'animal.

- Nos techniciens expérimentés limitent les douleurs et stress en utilisant des produits anesthésiants (anesthésie générale et locale) que nous connaissons et en utilisant des procédures expérimentales

simples (raffinement). Ainsi nous utilisons l'anesthésie lors de chaque acte susceptible d'engendrer une douleur pour éviter toute douleur. Le bien-être des animaux est également pris en compte lors de leur séjour en les hébergeant par groupe d'animaux compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu. Nous avons recours à la meilleure espèce (souris) parmi lesquelles des animaux modifiés génétiquement (transgéniques et congéniques) sont éventuellement disponibles (mais n'avons pas prévu d'en utiliser pour cette expérimentation). Notre connaissance des souris, du modèle de tolérance induit par la PCE permet de réaliser les expériences en engendrant le moins d'inconfort ou de douleur possible aux souris et en optimisant les expériences pour obtenir les résultats les plus fiables.

- L'étude conduite dans ce projet fait suite à beaucoup d'expériences *in vitro* (en dehors de l'animal) qui ont mis en évidence une partie des résultats obtenus. Elle ne peut être conduite qu'*in vivo* (chez l'animal) pour leur première partie puis chaque fois que cela est possible *in vitro* (en dehors de l'animal) (remplacement).

Le nombre maximal de souris utilisées pour réaliser les différentes expériences prévues est de 420 souris.

13655 Afin de formuler des aliments adaptés aux poulets il est nécessaire de savoir comment se digère les matières premières (céréales, graines, tourteaux, etc. ...) qui les composent. Les tables nutritionnelles utilisées pour formuler les aliments nécessitent d'être régulièrement mises à jour car les matières premières évoluent en fonction des années ou encore de leur origine. En maintenant ces tables nutritionnelles à jour, il est possible de formuler des aliments qui répondent aux besoins nutritionnels des poulets. Ceci permet de préserver l'état de santé et le bien-être des animaux, de maintenir une croissance harmonieuse, tout en limitant les rejets (azote, phosphore) dans l'environnement.

Actuellement, les techniques de digestion *in vitro* demeurent trop imprécises quand on cumule les incertitudes des modèles à celles associées à la variabilité analytique. Ainsi le seul recours est la mesure *in vivo*.

Dans le cadre de ce projet, la méthode de référence européenne est utilisée.

Sur les 5 ans, le projet est divisé en 40 essais (8 /an). Dans chaque essai, 7 matières premières et un témoin (soit 280 matières premières) sont analysées.

Un essai dure 24 jours. Les 14 premiers jours correspondant à une période d'adaptation en élevage classique sur litière au sol. Puis les poussins sont élevés dans des cages pendant 10 jours: il y a une période d'adaptation de 3 jours aux cages de 0.84m² x1 m de hauteur où les animaux sont élevés par 4 poussins / cage. Les cages sont équipées de plateaux de récupération de fientes, plateaux positionnés en-dessous du fond grillagé de ces cages. Puis pendant 7 jours, seul 2 poussins par cage sont conservés, les 2 autres poussins retournent en élevage classique sur litière au sol. Après une période d'adaptation aux aliments pendant 4 jours, les quantités d'aliments ingérés sont mesurées et l'intégralité des fientes sont récupérées quotidiennement pendant 3 jours. Ainsi par différence, les quantités de nutriments assimilés par les poussins sont estimées.

Chaque essai nécessite 288 animaux (9 groupes de 4 poussins x 7 matières premières+1 témoin) afin d'avoir une puissance statistique suffisante prouvant la fiabilité des résultats. Ainsi 11 520 poussins sont donc destinés à ces essais de digestibilité sur la période de 5 ans.

L'ambiance de la salle d'élevage est maîtrisée (chauffage, ventilation), les poussins ont un accès libre et permanent à l'eau de boisson. Une mise à jeûn de 17h est nécessaire pour vider le tube digestif afin de pouvoir réaliser les ratios précis entre les nutriments ingérés dans l'aliment et les nutriments excrétés dans les fientes. En dehors de cette mise à jeûn temporaire, les poussins sont nourris ad libitum. Dès que l'essai est terminé, les poussins retournent dans des conditions d'élevage classiques au sol.

Durant l'essai, la croissance des poulets et la mortalité sont contrôlées pour s'assurer qu'elles ne dérivent pas par rapport à des conditions d'élevage. En cas de dérive sur une matière première, les

animaux concernés sont mis hors essai et consomment un aliment standard en élevage classique au sol.

13656 Sous le nom de diabète on regroupe plusieurs maladies qui ont une caractéristique commune : l'hyperglycémie et ses conséquences au long cours sur de multiples organes dont les yeux, les reins, le cœur et les pieds. C'est une pathologie fréquente, 6% de la population adulte en France, et près de 20 % chez les personnes âgées de plus de 70 ans. La forme la plus fréquente de diabète est celle qu'on appelle diabète de type 2. En réalité cette forme regroupe probablement plusieurs causes ; et si l'obésité est un facteur déterminant du risque de diabète chez les sujets jeunes, la plupart des diabétiques français ne sont pas obèses et le rôle de l'obésité et du surpoids est moindre chez les sujets qui développent la maladie après 70 ans, suggérant que d'autres facteurs sont en cause. Les facteurs de risque cardiovasculaires classiques comme le tabac sont aussi des facteurs de risque de diabète, et diverses observations, parfois très anciennes suggèrent que l'hyperglycémie caractéristique du diabète pourrait être une conséquence d'une maladie des vaisseaux sanguins du pancréas. La maladie vasculaire du pancréas, appelée artériosclérose, est connue depuis le début du 20^{ème} siècle. Nous souhaitons montrer comment une maladie vasculaire du pancréas peut être cause d'hyperglycémie. Pour ce faire, il n'est pas possible de travailler sur des modèles cellulaires, car nous avons besoin de prendre en compte de multiples facteurs, dont le flux sanguin, la pression artérielle, etc. Le recours au modèle animal est indispensable pour avancer dans notre hypothèse.

L'ischémie, c'est-à-dire la diminution d'apport sanguin à un organe, est une cause majeure de réduction d'apport en oxygène aux tissus, conséquence de la maladie des vaisseaux sanguins.

Nous faisons l'hypothèse que l'ischémie pancréatique est impliquée dans le développement et l'aggravation des altérations de la sécrétion d'insuline et donc dans le développement du diabète.

En premier lieu, nous souhaitons développer deux modèles murins :

1/ un modèle de souris présentant une ischémie pancréatique chronique suite à une ligature de l'artère principale irrigant le pancréas, 2/ un modèle d'hypertension provoqué par la mise en place chirurgicale de pompe de diffusion de vasoconstricteurs sous la peau.

Dans ces différents modèles, nous étudierons le métabolisme du glucose (test de tolérance à l'insuline et au glucose), nous quantifierons les anomalies vasculaires, la différenciation des cellules Bêta, qui deviennent incapables de produire et sécréter l'insuline et la dégénérescence du pancréas exocrine. Nous quantifierons la sécrétion par les cellules Bêta des facteurs pro-angiogéniques, c'est-à-dire des facteurs qui sont nécessaires pour la génération de nouveaux vaisseaux, afin de compenser l'ischémie. Ces observations serviront de base pour déterminer les cibles d'éventuelles interventions pharmacologiques. Les animaux utilisés seront des souris mâles adultes.

Remplacement. Ces modèles expérimentaux animaux sont une sous-partie de notre travail sur l'ischémie pancréatique. Nous cherchons à valider *in vivo* des mécanismes cellulaires préalablement identifiés par des études *in vitro*. Autant que possible, nous nous pencherons également sur des modèles n'impliquant pas l'utilisation d'animaux. Ainsi, nous réaliserons une étude des anomalies fonctionnelles et moléculaires des cellules Bêta en situation d'hypoxie (culture cellulaire).

Réduction Le nombre de souris utilisées sera de 174 pour un projet de 5 ans. Pour chaque procédure des analyses statistiques ont permis de déterminer le nombre d'animaux nécessaires par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et valorisables. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides scientifiquement.

Raffinement l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement, de soins ainsi que les méthodes utilisées seront conformes aux recommandations actuelles afin de réduire au maximum souffrance, douleur, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les procédures comporteront des gestes de chirurgie limités et seront réalisées par des expérimentateurs confirmés. La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie et avec l'administration

d'analgésiques et d'antalgiques pour maîtriser la douleur avant pendant et après la chirurgie. L'état général des animaux sera suivi et évalué quotidiennement par des échelles adaptées aux procédures réalisées. De plus, des points limites ont été établis avec une grille d'évaluation entraînant l'arrêt systématique de la procédure et l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Enfin, tous les animaux seront euthanasiés entre 4 et 6 semaines après la chirurgie. Les pancréas seront alors prélevés et analysés en détails pour caractériser leur l'état.

A terme, si nos travaux confirment que l'ischémie est une cause de déficit de sécrétion d'insuline et de modification des cellules Bêta, ils permettront de repenser le Diabète de Type 2.

Nous pourrions alors envisager la correction de ces désordres par une thérapie ciblée sur les vaisseaux chez les patients diabétiques.

13657 Les xénogreffes, modèles de tumeurs humaines implantées chez la souris.

Au sein de notre laboratoire, nous développons et entretenons des xénogreffes qui résultent de la greffe chez la souris de fragments tumoraux de patients obtenus au décours d'une intervention chirurgicale (« déchets post-opératoires ») et avec leur consentement.

Ces xénogreffes sont actuellement le modèle tumoral le plus proche des tumeurs des patients et permettent la réalisation d'études pharmacologiques dont le potentiel prédictif clinique est très élevé. Ainsi elles constituent un outil primordial pour tester l'efficacité de nouveaux médicaments ou encore de nouvelles combinaisons ou posologies de médicaments. Elles permettent également dans certains cas, une aide à la prescription pour le clinicien quand il a été possible de montrer l'efficacité d'une molécule sur la xénogreffe issue de la tumeur du patient sur l'animal.

Ce caractère prédictif dépend toutefois de la possibilité de sélectionner les xénogreffes appropriées et donc d'avoir pu constituer des ensembles représentatifs de la diversité des tumeurs de patients. Cela nécessite le développement d'un grand nombre de modèles tumoraux différents pour une même pathologie.

Notre laboratoire a déjà développé un nombre important de modèles de différents types tumoraux (sein, poumon, côlon, mélanome, rétinoblastome, ovaire, lymphomes...), cependant nous continuons à greffer de nouvelles tumeurs de patients qui sont sélectionnées au préalable avec les cliniciens afin d'obtenir des modèles importants, représentatifs de sous-types tumoraux que nous n'avons pas encore, ou trop peu, réussi à développer.

Ainsi, nous prévoyons pour ce projet d'établissement et de maintien de banque de modèles tumoraux l'utilisation de 15960 souris en cinq ans, ce nombre qui est important, est calculé en réduisant l'utilisation de ces animaux au minimum nécessaire. Les procédures mises en œuvre permettant l'obtention de ces modèles sont de deux principaux types :

- la greffe

Elle se fera de manière localisée (en localisation inter-scapulaire, intra-rénale ou orthotopique, c'est-à-dire spécifique du type tumoral) ou systémique (par injection de cellules tumorales par voie veineuse dans le but d'obtenir des modèles d'étude métastatique),

- les traitements et/ou la castration chirurgicale des animaux greffés qui permettent le développement de résistance à des traitements d'intérêt dans des modèles préalablement existants. Ces modèles sont appelés « variants » et permettent l'étude de la mise en place des résistances ainsi que la recherche de moyens de les contrer.

La grande majorité des animaux fera l'objet de greffe sous-cutanée (inter-scapulaire), ce qui représente un geste peu invasif et le moins dommageable pour l'animal et permet l'évaluation la plus simple de l'efficacité thérapeutique des médicaments (13800/16000 animaux). Les greffes orthotopiques concerneront environ 1440 animaux, la création de modèles métastatiques 360 animaux et la greffe rénale 360 animaux.

La greffe orthotopique s'effectue au niveau du site de développement d'origine de la tumeur (œil pour le mélanome et le rétinoblastome, glande mammaire pour cancer du sein...) et permet de se rapprocher davantage par sa localisation du comportement physiologique de la tumeur chez le patient. La greffe dans la capsule rénale a pour but d'augmenter l'obtention sur l'animal de tumeurs

dont le taux de prise est très faible en implantation sous-cutanée. La capsule rénale pouvant favoriser la prise tumorale de par son statut de « sanctuaire immunologique » (absence des cellules immunitaires qui peuvent rendre la prise de greffes difficile) et son importante vascularisation. Par ailleurs, nous évaluons à 2500 le nombre de souris qui seront utilisées pour le développement et le maintien des « variants » tumoraux.

Nous prévoyons en 5 ans, l'établissement d'une centaine de nouveaux modèles et le maintien sur l'animal d'une centaine de modèles de tumeurs qui ont déjà été développés chez nous, les autres modèles étant conservés congelés et décongelés sur demande pour de nouveaux essais thérapeutiques.

Les points-limites en accord avec les recommandations internationales en cancérologie sont observés pour les animaux. Cependant la tumeur greffée en sous-cutanée est généralement utilisée avant que ces points ne soient atteints.

Le raffinement (coton, rondin de bois ou cabane) ajouté dans les cages permet de limiter la souffrance de l'animal alors que sa douleur sera diminuée grâce à l'utilisation d'antalgiques locaux et/ou systémiques.

13658 L'infection avec des vers intestinaux est une des parasitoses les plus fréquentes dans les pays en voie de développement. Ces infections peuvent induire des pathologies dont la sévérité dépend du nombre de parasites présents dans l'intestin. En plus de cet effet immédiat, des travaux récents ont montré que l'infection par des nématodes intestinaux peut également réduire la longévité chez les souris, même lorsque le parasite a été définitivement éliminé par l'hôte. Une des hypothèses pouvant expliquer ces effets à long terme porte sur l'augmentation de la perméabilité intestinale, qui induirait une inflammation chronique pouvant ainsi accélérer le processus de vieillissement. Dans ce projet nous souhaitons étudier l'effet de l'infection par un nématode sur la perméabilité intestinale au cours du vieillissement chez la souris.

Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Etant donné que l'objectif est d'étudier l'effet de la modulation de la perméabilité intestinale induite par le nématode, il n'est pas possible de substituer l'approche *in vivo* par une approche *in vitro*. Cependant, le nombre d'animaux (souris de la souche C57BL/6 femelles âgées de 2 et 12 mois) requis est réduit au minimum, avec 10 souris par groupe expérimental (basé sur le calcul de puissance statistique) (260 souris au total sur une période de 3 ans). Il est important de rappeler que l'infection par le nématode utilisé ici est asymptomatique, n'affectant pas l'état de santé des souris. Les bien-être des animaux sera respecté en les hébergeant en groupe (5 souris par cage) ce qui est important pour une espèce sociale et en enrichissant le milieu de la cage. Même si, comme évoqué précédemment, l'infection est bénigne, les souris seront surveillées durant tout le processus de vieillissement et si on constate une altération de leur état de santé, elles seront immédiatement sorties de l'étude et mises à mort.

13659 Le projet porte sur l'évaluation d'un additif alimentaire commercial composé d'huiles essentielles et de prébiotiques sur l'efficacité vaccinale contre la furonculose à *Aeromonas salmonicida* sub *salmonicida* (Ass) de la Truite Arc en Ciel. La furonculose est à l'origine d'une mortalité importante dans les élevages truiticoles ainsi que de pertes économiques en lien avec cette mortalité, dues à une non valeur commerciale des animaux morbides (furoncles musculaires) et des mesures de contrôle mis en place. Actuellement, les mesures de contrôle existent : mesure de biosécurité, vaccination et antibiothérapie, mais montre une efficacité relative. Dans le contexte actuel de limitation de l'usage des antibiotiques, la vaccination pourrait être un moyen alternatif. Cependant actuellement, la vaccination est peu utilisée par les éleveurs du fait d'une efficacité controversée et très variable. Notre objectif est donc d'évaluer un additif alimentaire ayant une activité immunostimulante potentielle qui pourrait augmenter la protection induite par un vaccin contre la furonculose.

Pour ce projet, 600 truites de 80 g seront utilisées. 650 truites seront achetées pour tenir compte de la mortalité pouvant être observée durant la phase d'acclimatation et de l'élimination de truites du fait d'une non conformité du poids. Huit lots de 75 poissons, conduits en triplicat (25 x 3), seront étudiés : 1 lot nourri avec l'additif non vacciné et non infecté, 1 lot nourri avec l'additif, vacciné et

non infecté, 1 lot nourri avec l'additif non vacciné et infecté, 1 lot nourri avec l'additif vacciné et infecté, 1 lot non nourri avec l'additif, non vacciné et non infecté, 1 lot non nourri avec l'additif, vacciné et non infecté, 1 lot non nourri avec l'additif, non vacciné et infecté, 1 lot non nourri avec l'additif, vacciné et infecté. L'expérimentation durera 14 semaines : 2 semaines d'acclimatation après réception des poissons, 4 semaines d'alimentation avec l'additif, 4 semaines après la vaccination et 2 semaines après le challenge infectieux. Toutes les manipulations des poissons (pesée, pose d'un tranpondeur, prélèvement sanguin, injection) seront réalisées après anesthésie des poissons. Les poissons seront maintenus dans des bacs possédant des systèmes d'enrichissement et les paramètres d'ambiance (température et oxygène) seront suivis en permanence par des sondes afin de contrôler les valeurs critiques d'élevage. Les poissons seront observés quotidiennement et les poissons moribonds seront retirés de l'expérimentation et euthanasiés. L'analyse des résultats obtenus sera effectuée à l'aide des tests statistiques ANOVA, khi2 et régression logistique. L'objectif étant d'étudier l'effet d'un additif alimentaire sur l'efficacité de la vaccination sur le poisson, aucune méthode de remplacement n'est envisageable.

13660 Notre thématique de recherche vise à étudier les mécanismes pathologiques et à développer des approches thérapeutiques pour la Neuropathie à Axones Géants (NAG), une maladie neurodégénérative fatale chez le jeune adulte et à ce jour, incurable.

Précédemment, notre laboratoire a généré différents modèles cellulaires de la pathologie, qui ont permis de révéler certaines actions de la protéine défective, la Gigaxonine mais aucun n'a permis d'étudier les mécanismes neurodégénératifs de la pathologie. Ainsi, bien que nous ayons mis un accent sur la mise en place de méthodes alternatives, nous avons besoin de générer un modèle *in vivo* de la pathologie pour étudier la complexité des mécanismes neurodégénératifs dans un contexte physiologique et proposer un modèle préclinique pour valider nos stratégies thérapeutiques, pour un passage efficace chez l'homme. Notre objectif est d'étudier le premier modèle "knock-in" de NAG, qui mime une mutation sévère d'un patient NAG, afin de suivre et de quantifier l'évolution des symptômes sensoriels et moteurs retrouvés chez les patients, pour en étudier les mécanismes de neurodégénérescence et aussi de disposer d'un modèle pour lequel nous pourrions tester des approches thérapeutiques.

Alors que l'utilisation de la souris constitue un modèle translationnel important pour NAG, nous avons élaboré une stratégie scientifique pour minimiser et optimiser l'utilisation des animaux en expérimentation. Ainsi, nous engagerons une étude sur une cohorte de 170 animaux, qui sera dédiée à évaluer le phénotype au cours du temps (niveau comportemental et histopathologique), une influence possible du sexe et à identifier les biomarqueurs de la maladie. Une surveillance quotidienne, une évaluation précise des points limites, ainsi qu'un enrichissement du milieu seront mis en place pour respecter les conditions d'étude selon les réglementations européennes.

Si notre nouveau modèle murin devait reproduire la pathologie NAG, nous serions le premier laboratoire à proposer une méthode d'expérimentation précise pour cette pathologie humaine fatale qui, en combinant l'étude du phénotype neurodégénératif au niveau comportemental et histopathologique constituera la base d'essais thérapeutiques futurs.

13661 Le système immunitaire a un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules cancéreuses, mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral. Ces dernières années, la compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en évidence l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les NK et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer. Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les thérapies cherchent à améliorer l'action des cellules T effectrices ainsi qu'à inhiber la fonction des cellules régulatrices. La voie PD-1/PD-L1 a un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T. Des anticorps ciblant cette voie PD1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab) ont été

généralisé pour réactiver la réponse T antitumorale et ont démontré des effets bénéfiques considérables dans le traitement de divers cancers. Ces essais cliniques ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques. Aujourd'hui, ces anticorps anti-PD-1/PD-L1 sont approuvés comme agents thérapeutiques de première ligne pour certains cancers du poumon et de la peau. Cependant il est estimé que seulement une partie des patients (15-60% selon le cancer) répondent à la thérapie et que plusieurs rechutes sont observées après traitement. Il est donc essentiel de chercher d'autres molécules et combinaisons thérapeutiques.

Dans le but de potentialiser l'effet des anti-PD-1/PD-L1, nous avons généré de nouveaux formats d'anticorps dit « bispécifiques » en fusionnant un anticorps anti-PD-1 à une molécule costimulatrice de la réponse T. Dans une précédente étude, nous avons testé *in vivo* dans des modèles de cancer chez la souris l'effet thérapeutique de ces anticorps bispécifiques. Nos résultats *in vitro* et *in vivo* montrent que nos anticorps bispécifiques stimulent la réponse cellulaire T et favorisent une réponse antitumorale durable par rapport à un anticorps anti PD-1 monospécifique. Dans cette saisine, nous proposons de réaliser une étude pharmacocinétique et pharmacodynamique (PK/PD) de ces nouvelles molécules bi-spécifiques dirigés contre des cibles humaines, dans un modèle pré-clinique de primates non humains. Nous réaliserons avec les mêmes prélèvements un bilan sanguin complet (bilan hépatique, biochimique et Numération formule sanguine) dans le but d'évaluer l'effet de nos molécules sur le système immunitaire et la biologie des macaques. Ainsi, un maximum d'analyses seront réalisées de façon à optimiser au mieux les procédures. Cette étape est nécessaire avant d'envisager un éventuel transfert chez l'homme, le système immunitaire de ces animaux étant très proches de celui de l'homme.

Pour ce projet de 3 ans, le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 18 macaques pour tester 3 anticorps : 1 monospécifique (faisant office de référence) et 2 bi-spécifiques différents à deux doses différentes. Dans un souci du respect de la règle des 3R, les animaux testés seront leur propre contrôle, de façon à pallier d'éventuelles variations interindividuelles, ainsi les valeurs de différents paramètres sanguins et biologiques analysés après injection de la molécule d'intérêt seront comparées aux valeurs individuelles avant injection, permettant d'obtenir un maximum d'informations à partir d'un minimum d'animaux. De plus, si les résultats de la dose n°1 de l'anticorps sont satisfaisants, l'anticorps à la dose n°2 ne sera pas testé.

Bien que nous ayons réduit le nombre d'animaux à son maximum, le modèle primate est indispensable à ce stade de notre étude et ne peut être remplacé par un autre système : effectivement, l'effet des molécules doit être évalué au niveau de l'organisme entier, et le primate correspond au modèle le plus proche de l'homme par son métabolisme, son système immunitaire et sa physiologie.

De façon à diminuer le stress, la souffrance, et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux seront hébergés avant le protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères. De plus, un enrichissement alimentaire, d'activité et d'aménagement des cages spécifiquement à l'espèce, est mis en place de façon compatible à la procédure.

- 13662** En cours de chirurgie pour retirer des tumeurs cérébrales, la stimulation électrique est utilisée pour stimuler, identifier et préserver les régions cérébrales impliquées dans les fonctions sensorimotrices et cognitives, afin d'assurer une bonne qualité de vie aux patients. Le principal effet indésirable de la stimulation électrique est le risque de générer des crises d'épilepsie en cours de chirurgie. Une alternative est la stimulation ultrasonore, qui a déjà été réalisée sur le cerveau de souris. Compte tenu de la taille de l'encéphale murin et de l'absence de sillons, il est nécessaire de valider l'utilisation des stimulations ultrasonores sur un encéphale avec une anatomie plus proche de celle de l'être humain (taille, sillons) comme le cerveau de brebis. Le projet est une étude de type « preuve de concept », qui sera la première étape, cruciale, avant de passer à des essais cliniques.

Le choix de la brebis comme modèle animal est motivé par trois raisons principales : son encéphale présente des sillons, comme celui de l'être humain ; l'anatomie de son encéphale est assez bien connue ; le crâne de brebis est d'épaisseur similaire au crâne humain, en comparaison au crâne de bélier beaucoup plus épais.

Compte tenu des différents paramètres à tester (fréquence ultrasonore, type de sonde, etc. ; points non détaillés pour clause de confidentialité), nous avons estimé un effectif maximal de 20 brebis pour notre projet qui seront soumises à trois procédures expérimentales : une anesthésie générale avec assistance respiratoire sous intubation, une neurochirurgie assistée par imagerie par résonance magnétique (IRM), des stimulations (électriques, ultrasonores) avec électromyogrammes des muscles de la face et des membres postérieur et antérieur. L'IRM préopératoire permettra de définir les limites du volet osseux, de faciliter la localisation des régions cérébrales à stimuler et de visualiser l'organisation des faisceaux de fibres blanches, voies de communication des neurones entre eux, au sein du cerveau.

Pour chacune des procédures expérimentales, nous nous efforçons de répondre à la règle des 3 R :

Réduction : S'agissant d'une étude de type preuve de concept, nous ne cherchons pas à obtenir des résultats statistiquement significatifs, mais à démontrer la faisabilité de la technique et à définir des seuils d'efficacité et de tolérance (pour les paramètres de stimulation ultrasonore du cerveau). D'après une étude de stimulation ultrasonore transcranienne chez la brebis, un effectif de 4 individus semble suffisant pour valider une nouvelle modalité de stimulation cérébrale. Nous avons choisi un effectif de 5 individus pour chaque procédure testée dans notre étude. Toutefois, notre étude étant une étude chirurgicale qui implique des risques de complication, et connaissant la variabilité interindividuelle des seuils de réponses aux stimulations électriques chez les patients humains opérés de tumeurs cérébrales, un effectif maximal de 10 animaux par objectif (étude d'efficacité / étude d'innocuité), apparaît suffisant pour garantir des résultats exploitables (soit 20 brebis adultes (2 à 4 ans) multipares de race Ile de France).

Raffinement : Pour limiter le stress et respecter leur bien-être, les brebis seront hébergées en groupe tout au long du projet (phases pré- et post-opératoires), une nourriture adaptée à leurs besoins et des soins ajustés à leurs conditions physiologiques seront apportés. Pour limiter la douleur, plusieurs mesures seront prises selon les phases de la procédure : (i) Lors de l'anesthésie, la taille de la sonde trachéale sera adaptée à la taille de l'animal et sera enduite d'une pommade anesthésiante (xylocaïne visqueuse 2%) ; (ii) Lors de l'IRM, les brebis seront équipées de bouchons d'oreilles pour limiter l'exposition au bruit et emmaillottées dans un linge en tissu pour éviter un contact direct avec la table d'acquisition et assurer un meilleur confort ; (iii) Lors de la chirurgie, les animaux recevront un traitement analgésique pour limiter la douleur pendant toute la phase expérimentale ; (iv) Enfin, pour éviter tout stress lors de la mise à mort, les animaux qui seront euthanasiés immédiatement après la chirurgie ne seront pas réveillés, la mise à mort sera réalisée par une injection létale de barbiturique (ce qui permet aussi de préserver l'intégrité du tissu cérébral) ; (v) Dans le cas particulier des animaux réveillés après la chirurgie, des traitements antibiotiques et analgésiques seront administrés et une surveillance de l'état de santé sera assurée (comportement alimentaire, posture de maintien, température corporelle). Quelle que soit la phase du protocole, si l'animal présente des signes de détresse vitale : bradycardie, tachycardie, détresse respiratoire, troubles locomoteurs (...) la décision de sa mise à mort pourra être prise si aucune amélioration de son état de santé n'est possible.

Remplacement : Cette preuve de concept ne peut être réalisée directement sur le sujet humain. En remplacement d'un modèle de primate non-humain, nous avons fait le choix de travailler sur la brebis dont l'encéphale est anatomiquement proche de celui de l'être humain.

13663 L'arthrose est la maladie musculo-squelettique la plus fréquente affectant environ 40% de la population de plus de 70 ans. L'arthrose est considérée comme une pathologie à évolution lente affectant tous les tissus entourant l'articulation atteinte. Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de ralentir l'avancée de la maladie qui nécessite le recours à la chirurgie dans les cas les plus sévères. Des avancées récentes par des études *in vitro* et *in vivo* publiées par des équipes

concurrentes ont proposé qu'une accumulation de cellules sénescents articulaires est à l'origine de la pathologie. En effet, ces cellules non-proliférantes peuvent altérer le tissu environnant. Avec ces travaux, il est néanmoins nécessaire de généraliser ces découvertes sur d'autres modèles précliniques arthrosiques afin de pouvoir tester une approche thérapeutique intra-articulaire transférable un jour aux patients.

Le but de ce projet est d'évaluer de nouvelles thérapies ciblant la sénescence articulaire sur l'évolution de l'arthrose. Cette arthrose sera soit induite chez des souris jeunes par injection de collagénase, soit apparaîtra naturellement chez les souris âgées. Pour réaliser ce projet, nous proposons :

1 - d'utiliser des animaux transgéniques (C57BL/6-p16luc) chez lesquels le gène rapporteur luciférase est sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'état de sénescence. Avec cette souris, ne souffrant d'aucun phénotype dommageable, nous pouvons facilement détecter la présence de la sénescence avec l'aide d'une caméra thermique CCD après injection de luciférine.

2- de traiter intra-articulairement les souris malades par injection d'agents capables d'éliminer les cellules sénescents *in vitro*.

Ce projet sera réalisé chez la souris car nous disposons de ce modèle transgénique et d'une longue expertise d'induction de l'arthrose chez ce rongeur. Nous utiliserons au maximum 240 souris au total dans ce projet, réparties en différents groupes.

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

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé en tenant compte des pertes éventuelles lors des protocoles et en se basant sur l'expérience acquise au laboratoire en termes d'incidence de l'arthrose chez la souris et de mise en évidence d'effet significatif sur les paramètres histologiques mesurés en fin d'expérience.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Les injections intra-articulaires se feront sous anesthésie gazeuse. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

- Remplacement : l'analyse du rôle de la sénescence cellulaire sur un modèle d'arthrose ne peut se faire que sur animaux vivants. Il n'est donc pas possible de prévoir une méthode substitutive pour répondre à la question scientifique de ce projet.

13664 L'option thérapeutique de choix pour le traitement des tumeurs broncho-pulmonaires de stade précoce est la chirurgie. Cependant, environ 20 à 30% des patients sont à haut risque chirurgical, et le traitement en radiothérapie conventionnelle n'a qu'une efficacité limitée sur la tumeur. La radiothérapie en conditions stéréotaxiques consiste à irradier de très petits volumes grâce à la convergence de mini-faisceaux et avec une précision balistique très importante, inférieure à 1 mm. Cette option thérapeutique a depuis 10 ans grandement amélioré la prise en charge thérapeutique des patients inopérables atteints de cancer broncho-pulmonaire de stade précoce. La réduction du volume d'irradiation autorise l'utilisation de protocoles d'irradiation plus agressifs avec de très fortes doses par fraction (hypofractionnement sévère, de 6 à 20 Gy par fraction au lieu de 2 Gy en fractionnement conventionnel) et assure un bon contrôle tumoral. Cependant, et malgré la précision balistique, certains patients développent des effets secondaires pulmonaires (pneumopathie radique de type inflammatoire ou fibreux).

Irradier de très petits volumes chez la souris n'est possible que depuis quelques années grâce à la commercialisation d'outils capables de générer des mini-faisceaux de l'ordre d'un à quelques millimètres. Depuis 4 ans au laboratoire, nous travaillons sur un modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris (P15-03 et P17-13). Nous avons acquis un recul important sur les effets cliniques et anatomopathologiques de la dose totale reçue et du volume pulmonaire irradié. En particulier, nous avons mis en évidence une augmentation massive du nombre de macrophages au niveau du site lésionnel et souhaitons poursuivre les projets sur le rôle de ces nombreux macrophages dans le développement des lésions pulmonaires. Les monocytes (précurseurs des macrophages) sont recrutés depuis la circulation sanguine via le récepteur CCR2 (C-C chemokine receptor type 2). Plusieurs travaux ont démontré que les souris déficientes en CCR2 (souris CCR2-

/-) sont protégées de la fibrose pulmonaire dans plusieurs modèles, suggérant un rôle majeur des macrophages dans le développement de la fibrose pulmonaire. Le but de ce projet est d'utiliser des souris CCR2-/- comparée à des souris sauvages pour évaluer le rôle des macrophages dans le développement des lésions pulmonaires aiguës et tardives suite à une irradiation stéréotaxique.

La lésion tissulaire sera réalisée grâce à une irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris, avec un irradiateur disponible sur le site piloté par une physicienne. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques et modèle déficient en CCR2. Compte-tenu de l'étude d'un phénomène à l'échelle d'un organisme dans son ensemble, un modèle *in vitro* ne permettrait pas de répondre aux questions posées par le projet.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 450.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables.

Les analyses se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal après son euthanasie. Les procédures d'irradiation seront réalisées sous anesthésie et les animaux seront surveillés avec attention pendant toute la durée du projet.

13665 L'embolisation artérielle est une intervention thérapeutique de radiologie interventionnelle, consistant à obstruer une artère en injectant un produit ou en utilisant un dispositif médical. Elle permet d'arrêter le flux sanguin qui constitue ou qui nourrit une lésion, ou de boucher une lésion portée par l'artère que l'on veut emboliser. La nature des lésions à emboliser est très variable : il peut s'agir de malformations congénitales des vaisseaux, de lésions secondaires à un traumatisme ou des tumeurs bénignes ou malignes. L'embolisation est réalisée à l'aide de matériaux choisis selon la nature de la lésion : petites particules solides (coils, plugs, microsphères), liquides qui se solidifient dans la lésion (colle), ou petits ressorts métalliques (stent).

La technique utilise un cathéter introduit au niveau de l'artère fémorale, qui va être dirigé sous rayons X vers l'artère à traiter par l'injection du matériau. Ce projet a pour but l'évaluation d'agents d'embolisations divers, leur utilisabilité ainsi que leur efficacité.

L'embolisation est une pratique courante en clinique permettant une alternative à la chirurgie qui est invasive, douloureuse et parfois non réalisable. Cette procédure permet une récupération beaucoup plus rapide pour les patients et une durée d'hospitalisation plus courte. Dans ce contexte, proposer aux praticiens des solutions diverses répondant à toutes les utilisations potentiellement éligibles à l'embolisation est un problème de santé publique. Seule l'expérimentation *in vivo*, mimant le plus fidèlement la vascularisation humaine permettra de répondre à ce défi par l'évaluation préclinique des nouveaux agents d'embolisations.

Le porc est le meilleur modèle animal pour l'étude de ces nouveaux agents, avec une vascularisation proche de celle de l'homme, en termes de diamètre des vaisseaux. Cet animal possède également une particularité anatomique, son réseau vasculaire permettant d'être proche des MAV (Malformation Artério-Veineuse) soignée par l'embolisation chez l'homme. Ce modèle animal permet également l'étude de plusieurs types d'agents d'embolisations utilisés pour diverses pathologies humaines (fibromes utérins, MAV).

Un premier tri des agents potentiellement intéressants est fait à partir des mesures physico-chimiques et des techniques *in vitro* (méthode de flux) pour ne sélectionner que les plus prometteurs. Ce projet nécessitera 72 animaux.

L'expérimentation *in vivo* est réalisée par du personnel expérimenté, pour éviter toute douleur, les embolisations se feront sous anesthésie générale avec des antalgiques pendant toute la durée de l'intervention.

Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. A terme, les résultats de ce projet pourraient permettre d'identifier de nouveaux agents d'embolisation pour des besoins médicaux non encore satisfaits, et/ou d'améliorer les solutions mises actuellement à la disposition des praticiens.

13666 L'apparition de métastases constitue un mauvais pronostic dans le traitement du cancer par la plus grande difficulté à intervenir chirurgicalement et à éliminer les cellules métastatiques par chimio- ou radiothérapie. La compréhension des mécanismes de genèse de ces cellules demeure prépondérante dans la lutte contre le cancer et dans la réduction de la mortalité. Des études *in vitro* suggèrent un rôle de la protéine Elov15 dans la prolifération cellulaire et le processus métastatique. En effet, le potentiel prolifératif et les caractéristiques de migration des cellules dépendent de l'expression de Elov15. Ces propriétés cellulaires contribuent à la modulation de la croissance tumorale et au développement de métastases dans un organisme.

Notre projet vise à déterminer le rôle de l'enzyme Elov15 dans le processus tumoral et métastatique pulmonaire dans un modèle expérimental murin par l'utilisation de lignées cancéreuses humaines dont l'expression Elov15 est modulée.

Remplacement : L'utilisation d'un modèle murin de cancer est nécessaire car la progression tumorale et le processus métastatique sont des mécanismes complexes ne pouvant être modélisés *in vitro*. En effet, la capacité de dissémination des cellules cancéreuses par la voie sanguine et de colonisation des tissus pulmonaires ne peut s'observer que dans un modèle animal. Ainsi, les similarités physiologiques et métaboliques entre la souris et l'Homme permettront de transposer les résultats obtenus à la situation des patients atteints de cancer. Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons déterminé l'effectif nécessaire par groupe en s'appuyant sur notre expérience antérieure en prenant en compte la variabilité interindividuelle et à l'aide d'un outil statistique prédictif permettant d'obtenir un résultat fiable et analysable. Raffinement : Les souris soumises à cette procédure expérimentale seront maintenues en groupe pour favoriser la sociabilisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. Les souris seront maintenues sans traitement antalgique pour ne pas interférer avec la réponse inflammatoire et éviter des modifications de croissance tumorale. Elles seront surveillées quotidiennement et tout signe de douleur ou souffrance conduira à leur mise à mort. Au total, 160 souris femelles NMRI NUDE seront utilisées.

13667 Une gestion clinique efficace lors d'une exposition aux rayonnements ionisants passe obligatoirement par un diagnostic et un pronostic fiables afin de guider les cliniciens dans leur approche thérapeutique. Dans ce cadre, l'objectif de ce projet est d'identifier un ou plusieurs indicateurs biologiques moléculaires, à valeur prédictive de la survenue d'une brûlure radiologique, et pronostique du degré de sévérité encouru.

La stratégie repose sur l'utilisation de techniques de pointe à spectre large, de type « omique », très prometteuses pour la recherche de nouveaux marqueurs d'exposition ou d'effets biologiques dans le cas d'une exposition aux rayonnements ionisants. Ce concept d'indicateur de pronostic ou de diagnostic moléculaire implique des caractéristiques intrinsèques : spécifique d'un organe-cible ou d'une fonction métabolique, facilement accessible, utilisable en routine et capable de renseigner sur l'impact biologique des modifications des systèmes physiologiques de l'individu exposé. Du fait de leur fort potentiel d'outil de criblage analytique, les approches de type « omique », telles que l'étude des micro-ARN (petits ARN non-codants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes) et des métabolites (produits finis résultant du métabolisme cellulaire), constituent des atouts considérables susceptibles d'apporter une aide significative dans la prise en charge médicale et sanitaire des situations d'urgence radiologique et nucléaire.

A l'aide d'un modèle de brûlure radiologique établi chez la souris, les micro-ARN et les métabolites présents dans les fluides biologiques (sang, urine) seront analysés à différents temps en réponse à une exposition à différentes doses de rayonnements ionisants. Les marqueurs moléculaires identifiés seront intégrés au moyen de modèles mathématiques en score « multi-échelles » susceptible de prédire le risque d'occurrence et la sévérité de la brûlure radiologique. Dans le but d'identifier ces nouveaux indicateurs biologiques dans les fluides corporels afin de mieux prédire la survenue, et pronostiquer la sévérité d'une brûlure radiologique, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*.

Pour ce projet, le nombre maximum estimé d'animaux est de 1080.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, ce protocole expérimental est établi avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Le nombre d'animaux utilisés pour les procédures n°3 et 4 sera déterminé en fonction des résultats des procédures n°1 et 2. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (irradiation des animaux sous anesthésie, surveillance des animaux avec établissement de scores, ...). Différents paramètres fonctionnels seront mesurés par les techniques non invasives pour évaluer l'intégrité tissulaire et vasculaire. D'autres analyses seront réalisées sur des prélèvements faits sur animal euthanasié.

13668 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables.

Chez la femme, le cancer du sein est le plus fréquent et la première cause de mortalité par cancer. Le cancer du sein appelé triple-négatif est un sous-type de cancer qui représente environ 15 % des cancers du sein et est particulièrement agressif. A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie ciblée pour ce sous-type de cancer. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules efficaces. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. Nous voulons montrer l'efficacité d'une molécule sur le ralentissement de la prolifération tumorale sur des souris porteuses de tumeurs prélevées chez des patientes atteintes de cancers du sein triple-négatif.

Pour ce projet nous voulons utiliser 8 modèles de cancers du sein triple-négatif avec des caractéristiques différentes. Cette étude nécessite alors l'utilisation de 368 souris Nude sur une durée de deux ans et demi. Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de tumeurs humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xénogreffes de tumeurs humaines.

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

- Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.
- Réduction : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement.
- Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal : les points limites ont été établis dans la procédure expérimentale, les animaux seront surveillés quotidiennement, l'hébergement sera modifié par enrichissement du milieu et le nombre d'animaux par cage sera limité.

13669 L'augmentation mondiale de l'obésité est telle que l'on parle maintenant « d'épidémie ». Les complications cardiovasculaires, tel que les troubles du rythme cardiaque, sont la première cause de mortalité au cours de l'obésité et du diabète. Les contractions rythmiques du cœur sont sous le contrôle d'un influx électrique, mesuré grâce à l'électrocardiogramme. Cet influx électrique permet de libérer une grande quantité de calcium stocké dans un réseau de citernes, à l'intérieur des cellules. Le calcium augmente rapidement dans la cellule et provoque la contraction. Pour se développer, la contraction consomme de l'énergie, produit sous forme d'ATP par des centrales énergétiques cellulaires : les mitochondries. Cette production d'ATP est réalisée à partir des matières premières apportées par l'alimentation (glucides et lipides) et nécessite l'oxygène fourni

par la respiration. Pour s'adapter à la demande énergétique imposée par l'influx électrique, une partie du calcium libéré des citernes entre dans les mitochondries et accélère la production d'ATP. Cette adaptation du métabolisme énergétique est indispensable au maintien de la fonction cardiaque. Au cours de l'obésité du diabète de type 2, les acides gras (ou lipides) deviennent rapidement la source énergétique exclusive du cœur. Les conséquences sont dramatiques, d'un côté la consommation d'oxygène explose et la production d'ATP diminue, et de l'autre, les citernes calciques fuient, la contraction s'effondre et des troubles du rythme apparaissent. L'efficacité du muscle cardiaque est altérée, c'est la cardiomyopathie. Tout porte à croire que les troubles précoces de la fonction des mitochondries sont à l'origine du développement de la cardiomyopathie et des troubles du rythme associé. Dans ce travail nous déterminerons comment un régime riche en graisses affecte le calcium et la fonction mitochondriale et quelles en sont les conséquences sur le développement des troubles du rythme. Le développement de la cardiomyopathie diabétique étant associé à une diminution de la capacité des mitochondries à capter du calcium, les souris suivront 2 traitements en parallèle par mini-pompe osmotique implantable : le kaempferol (substance trouvée dans de nombreux aliments tels que les fraises, les brocolis et les épinards) et l'efsevin. Ces 2 composés sont connus pour activer l'entrée de calcium dans la mitochondrie et diminuer les troubles du rythme associé à la dysfonction des citernes calciques.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris (nombre estimé: 600 sur 5 ans). Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (utilisation du même contrôle pour les différents traitements testés, utilisation des mêmes souris pour plusieurs expériences, choix de la télémétrie pour acquisition de l'électrocardiogramme sur animaux vigiles, choix de l'exploration électrophysiologique non invasive trans-oesophagienne). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux en appréciant au mieux les points limites (mise en place d'une grille d'évaluation des signes de douleurs), en utilisant une anesthésie et analgésie avant toute chirurgie et en post-opératoire afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse.

13670 La formation des étudiants (de Licence à Master 2) en Biologie et plus particulièrement en Physiologie nécessite que ceux-ci acquièrent un minimum d'expérience dans le domaine de la manipulation des animaux vivants et la réalisation de manipulations courantes qu'ils seront amenés à reproduire ultérieurement dans leur carrière (techniciens en Biologie, ingénieurs ou chercheurs). En septembre 2019, plus de 1000 étudiants se sont inscrits en licence sciences de la vie. Leur avenir universitaire et potentiellement de chercheur ou enseignant-chercheur en physiologie animale nécessite une pratique active en physiologie, science étudiant les mécanismes intégratifs de l'organisme entier. C'est cette expérience qui leur permet de faire un choix réfléchi pour leur avenir, sans cette expérience, ils ne sont pas en mesure d'évaluer leur capacité à pratiquer de la physiologie sur l'animal entier. Par année de licence 3 (L3) au master, environ cent étudiants sont concernés par plusieurs Unité d'Enseignement (UE) de physiologie animale. Les Travaux Pratiques (TP) sont en lien direct avec l'enseignement dispensé dans ces différentes UE.

Plus précisément, dès la L3, les étudiants (5 groupes de 20 étudiants /an au semestre 1 puis 3 groupes de 16 étudiants/an au semestre 2) sont préparés aux séances de TP : ils suivent tous une séance de Travaux Dirigés (TD) (dispensée par un concepteur, formé en chirurgie) au cours de laquelle les différents TP sont explicités. Les techniques de canulations et de chirurgie sur l'animal sont bien décrites et commentées à l'aide d'un support filmographique. Ils passent ensuite à la pratique des canulations (4 étudiants pour un animal). Tous ces étudiants de Licence sont également sensibilisés à la réglementation sur l'expérimentation animale et visitent virtuellement une animalerie par visionnage vidéo. Par exemple, au premier semestre de la licence 3 de biologie cellulaire, moléculaire et physiologie (BCMP), les enseignements portent sur la fonction cardio-respiratoire. Les TP permettent d'étudier la fonction respiratoire chez l'homme sur un logiciel adapté, de simuler sur ordinateur le fonctionnement du cœur chez le rat (utilisation de méthodes alternatives), l'automatisme cardiaque ex-vivo et la régulation de la pression artérielle et de

l'équilibre acido-basique chez l'animal entier (pas de remplacement possible). Enfin, nos étudiants de master 2 (12 étudiants/an) suivent la formation de concepteur dans une école vétérinaire car ils feront de l'expérimentation animale.

Nous prévoyons d'utiliser 750 animaux en 3 ans. Le calcul est obtenu ainsi :

190 rats maximum sont utilisés par an, soit sur la durée totale du projet (3 ans) 570 rats. 60 truites arc en ciel sont utilisées par année soit un total de 180 truites pour 3 ans.

Nous travaillons dans le souci de la règle des 3 R :

* Réduction : le nombre d'animaux est réduit au minimum statistique requis pour mener à bien ce projet.

* Raffinement : tout au long du protocole, les conditions de stabulation sont réalisées dans un souci de bien-être de l'animal. Toutes les procédures expérimentales sont réalisées par des personnes formées et habituées à travailler avec des animaux de laboratoire, dans des conditions d'analgésie et d'anesthésie conformes à la réglementation et en accord avec la gravité des procédures. Les animaux sont suivis quotidiennement.

* Remplacement : L'utilisation des modèles murin et poisson est inévitable car nous travaillons sur les mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme entier. Des séances utilisant des méthodes alternatives sont également incluses dans le programme d'enseignement mais toutes les séances ne peuvent être "remplacées".

13671 Les macrophages sinusoïdaux des ganglions lymphatiques sont des cellules très importantes dans la défense contre des infections virales, comme les virus transmis par les moustiques (Dengue, Zika, Chikungunya). Toute information sur le processus biologique de la formation de ces macrophages pourrait apporter des nouvelles pistes pour combattre plus efficacement ces maladies infectieuses. Nous avons identifié deux récepteurs appartenant à la famille de TNF qui jouent un rôle dans la différenciation de ces macrophages. Afin de mieux déterminer leur mode de fonction, nous génèrerons des souris dont les macrophages sont dépourvus de ces récepteurs. Les souris sont ensuite immunisées par le virus de la vaccine dans l'objectif de démontrer une dysfonction de la réponse immunitaire contre ce virus.

Pour ce faire, nous nécessitons un modèle animal (souris), car actuellement il n'existe pas de méthodologie qui reproduit la complexité cellulaire nécessaire afin d'étudier la réponse immunitaire. Le nombre total des souris pour ce projet est de 320 animaux. Les immunisations avec le virus du vaccin seront effectuées sur des souris sous anesthésie générale par voie sous-cutanée ou voie intra-dermique et par un personnel compétent. Des prélèvements sanguins seront effectués par la voie submandibulaire. Dans le souci de raffinement, les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi et recevront de l'anesthésie et des soins appropriés. Nous éviterons des interventions de longue durée et appliquerons des points limites établis préalablement afin d'évaluer, d'éviter et de soulager la souffrance. Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature, notamment sur les techniques permettant de localiser, identifier et analyser ces macrophages afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni.

13672 L'objectif général du projet est de tester la faisabilité de l'amélioration génétique de l'efficacité alimentaire (capacité à convertir la prise alimentaire en gain de poids) du bar européen.

Suite à l'évaluation de l'efficacité alimentaire dans des aquariums individuels, nous avons sélectionné les « bons », les « moyens » et les « mauvais » poissons. Dans ce projet, ces poissons seront reproduits par fécondation artificiel pour générer trois lignées : « bonne », « moyenne » et « mauvaise ».

Ces lignées seront comparées pour évaluer la réponse à la sélection. Cette comparaison sera faite en trois étapes : 1) une évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle des poissons pour les lignées « bonne » et « moyenne » (n = 100 par lignée, 200 poissons au total) ; 2) une évaluation de l'efficacité alimentaire de groupe incluant les trois lignées afin de valider l'impact en condition de production (n = 250 par lignée, 750 poissons au total) ; et 3) une évaluation de la tolérance au jeûne

en fin d'expérimentation sur les mêmes poissons que précédemment. Il a été mis en évidence précédemment une relation entre tolérance au jeûne et efficacité alimentaire, évaluer ce critère est donc important.

Réduction : les effectifs (950 poissons au total) ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes sur le bar et de tests statistiques pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés et différencier chaque lignée significativement.

Raffinement : pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie. Durant de l'évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle, les poissons sont isolés, mais nous avons optimisé la structure au maximum pour limiter le stress et favoriser le bien-être des poissons : 1) les aquariums sont transparents permettant à chaque poisson de voir des congénères, 2) chaque aquarium est équipé d'une « cachette » en PVC (de 10 cm de diamètre et 10 cm de long) pour permettre à chaque poisson de se cacher, 3) les sources de nuisances sonores et vibratoires ont été placées à l'extérieur de la pièce et une porte anti-bruit a été installée, 4) enfin la luminosité a été optimisée de façon de mimer l'aube et le crépuscule.

Remplacement : ce type d'expérimentation où la variabilité observée et recherchée est liée à l'individu, ne peut se faire que sur animaux vivants. Il n'y a donc pas de remplacement possible.

13673 La fibrose (ou sclérose) résulte d'une accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC) et est un facteur clé de la dysfonction progressive des organes dans de nombreuses pathologies chroniques graves tel que la fibrose pulmonaire idiopathique, la fibrose rénale ou les stéatoses hépatiques. Dans des conditions normales, la MEC joue un rôle essentiel dans le soutien structurel, l'adhérence, le mouvement et la régulation des cellules, ainsi que dans la régénération des tissus. L'exposition à des substances toxiques comme l'alcool, une infection virale ou des lésions tissulaires, qu'elles soient aiguës ou chroniques, peut déclencher le développement d'une fibrose par la production excessive de MEC. La distorsion de l'architecture tissulaire et le dysfonctionnement d'organes résultant des modifications fibrotiques peuvent entraîner une morbidité grave, voire la mort. En effet, des études épidémiologiques récentes indiquent que la fibrose contribuerait à environ 45% des décès dans les pays développés. Les traitements classiques comprennent des anti-fibrotiques (pirfénidone, nintedanib), corticoïdes et immunosuppresseurs qui sont généralement efficaces contre les formes modérées de fibrose mais pas très bien tolérés. Cependant il n'y a pas de traitements efficaces pour les formes sévères de fibrose, la greffe d'organe constituant le dernier recours, mais qui nécessite aussi un traitement d'immunosuppresseur lourd permanent. Il est donc urgent de développer des traitements plus efficaces et mieux tolérés qui puissent spécifiquement enrayer la progression de la fibrose.

Les procédures qui constituent ce projet s'inscrivent dans le cadre du développement de traitements innovants dans le domaine des maladies fibrotiques. Elles nécessiteront l'utilisation de rongeurs pour démontrer l'efficacité des composés et déterminer les doses qui seront administrées chez le patient. Les procédures consisteront à mettre en place et à utiliser des modèles standards bien décrits dans la littérature. Il n'existe pas à ce jour de méthodes dites alternatives qui puissent reproduire la complexité des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de ces maladies chroniques. Le recours à l'animal de laboratoire permettra le développement de nouveaux traitements visant à améliorer la qualité de vie de millions de patients sévèrement affectés par les maladies fibrotiques.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Des animaux de laboratoires doivent être utilisés parce qu'à notre connaissance, il n'existe pas de modèles *in silico* ou *in vitro* qui reproduisent l'extrême complexité des maladies hépatiques, celles-ci pouvant impliquer de nombreux tissus et organes, et pour lesquelles les mécanismes biologiques sous-jacents sont encore très largement incompris. Seul un modèle animal peut reproduire les interactions de ces systèmes biologiques complexes qui sont nécessaires pour évaluer l'efficacité des nouveaux traitements.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera déterminé à partir de données issues d'études similaires rapportées dans la littérature. Des analyses de puissance statistique seront utilisées sur les données des premières études de mise en place des modèles pour déterminer si le nombre d'animaux par lot peut encore être réduit.

Raffinement :

Les animaux seront hébergés dans des locaux conformes aux standards réglementaires. Ils seront groupés dans des cages contenant de l'enrichissement et des matériaux spécialisés pour faciliter la nidification. Les procédures jugées douloureuses ou constituant une source d'inconfort ou de stress se feront sous anesthésie gazeuse de courte durée. Les animaux feront l'objet d'une surveillance clinique journalière sur la durée de l'étude. La consigne TLSE-CEPAL-CON 009 relative aux points limites en expérimentation animale sera suivie en cas de complications. Des soins adaptés seront donnés aux animaux affectés, par ou sous autorité du vétérinaire ou euthanasiés selon les critères définis dans la consigne.

Le projet nécessitera un maximum de 10500 rongeurs, soit 2 100 par an pendant 5 ans.

13674 Le système immunitaire est connu pour jouer un rôle essentiel dans la compréhension et le traitement de pathologies d'importances comme certaines infections virales (SIDA ou hépatites), de nombreux cancers, ou les maladies inflammatoires (asthme). À titre d'exemple, l'immunothérapie, représente une avancée médicale majeure de ces dernières années. Elle a pour principe la stimulation du système immunitaire du patient atteint de cancer, afin de lui permettre de détruire les cellules tumorales qui menacent son organisme.

Pour mieux comprendre le système immunitaire et soutenir le développement de thérapies innovantes, les chercheurs ont besoin de modèles précliniques prédictifs. En étudiant des espèces autres que l'homme, le risque est grand que les conclusions scientifiques issues d'études sur le rat ou le macaque, par exemple, ne soient pas transposables à l'espèce humaine. De tels échecs impliquent non seulement une perte significative d'animaux, mais aussi la mise à l'écart, parfois erronée, de candidats médicaments porteurs d'espoir pour de nombreux patients.

En greffant des cellules souches humaines à des souris immunodéprimées, nous pouvons reconstituer un système immunitaire humain, fonctionnel, et objectiver l'effet qu'aura un médicament chez l'homme.

Reduction:

Un total de 10000 souris adultes seront utilisées, couvrant une période 5 ans, permettant de réaliser des tests précliniques sur 8250 souris, représentant environ 200 études. Le nombre de souris par étude sera de 5 à 10 individus par groupe, avec un minimum de 4 groupes (1 groupe placebo et 3 groupes traités), soit en moyenne 40 souris par étude. Le nombre exact de souris par étude sera bien entendu réduit en fonction d'études statistiques adaptées aux effets attendus du traitement.

Raffinement

Les souris seront hébergées en cage ventilée, par groupe social stable de 5 à 6 individus. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois, permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés.

À leur arrivée, les souris recevront une période d'acclimatation et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlées en permanence.

Remplacement

Les tests *in vitro* seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, il n'est, actuellement, pas possible de recréer *in vitro* un environnement complexe comme le système immunitaire, et mimer son interaction avec une tumeur, par exemple. La souris ayant un système immunitaire humanisée

constitue donc un modèle scientifiquement valide, robuste et indispensable pour le développement et la mise au point de traitements innovants pour des pathologies impliquant le système immunitaire.

13675 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en neurologie (ex : chirurgie d'hernie discale). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les petits ruminants et les lagomorphes sont des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain. Les porcins et les rongeurs peuvent également être utilisés dans des cas particuliers et l'utilisation du modèle canin est envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 360 par an.

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

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

13676 Depuis plusieurs années, de nouvelles approches thérapeutiques ont bouleversé le traitement du cancer (immunothérapie, virus oncolytique) et apportent, chaque jour, davantage d'espoir aux patients. Pour soutenir le développement de ces médicaments innovants, il est nécessaire d'utiliser des modèles précliniques prédictifs.

Grace à notre expertise dans les études précliniques, nous permettons aux chercheurs universitaires, industriels et biotechnologiques d'étudier les interactions entre le système immunitaire d'un organisme vivant, une tumeur et un traitement en travaillant avec des souris non-humanisées (NCG, NOG, NSG, BRG, Nod/Scid, C57BL/6, BALB/c) et humanisées (Hu-NCG et Hu-NOG). Ceci permet d'objectiver les effets qu'aura une molécule chez un patient humain tout en réduisant la barrière d'espèce homme-souris.

Les souris recevront une greffe de lignée tumorale ou de patient-derived xenografts (PDX). Les cellules seront injectées en sous-cutanée, ou à l'aide d'un trocart inséré par une incision. Les candidats médicaments seront administrés par gavage, injection intrapéritonéale, intraveineuse ou intramusculaire, dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson, en fonction du composé étudié.

RAFFINEMENT

Les souris seront hébergées en cage ventilée, par groupe social stable. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois, permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés. Les souris recevront une période d'acclimatation de 7 jours, minimum, avant l'entrée en projet, et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlés en permanence.

Les souris seront monitorées tous les jours pour vérifier l'absence de souffrance. Celle-ci sera objectivée par une échelle de scoring adaptée aux études en immuno-oncologie. La croissance tumorale et le poids de l'animal seront monitorés deux à trois fois par semaine. La fréquence pourra être adaptée au besoin de l'étude, si nécessaire.

REDUCTION

Un total de 5000 souris adultes seront utilisées, couvrant une période 5 ans, permettant de réaliser 165 études précliniques. Le nombre de souris par étude sera de 5 à 10 individus par groupe, avec un minimum de 4 groupes (1 groupe placebo et 3 groupes traités). Le nombre exact de souris par étude sera réduit en fonction d'études statistiques adaptées aux effets attendus du traitement.

REMPLACEMENT

Les tests *in vitro* seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, il n'est, actuellement, pas possible de recréer *in vitro* un environnement complexe comme le système immunitaire, et mimer son interaction avec une tumeur, tout en objectivant les effets potentiellement toxiques d'un candidat médicament. La souris constitue donc un modèle scientifiquement valide, robuste et indispensable pour le développement et la mise au point de traitements innovants pour des pathologies cancéreuses.

13677 Hippocrate, Avicenne et la médecine traditionnelle chinoise considéraient l'odeur comme une source de diagnostic et le changement d'odeurs comme le témoin d'une pathologie. Plusieurs travaux scientifiques récents ont confirmé que bon nombre de pathologies s'accompagnent en effet de modifications d'odeurs corporelles. Les cancers, seconde cause de décès à travers le monde et première cause de décès prématuré avant 65 ans en France, n'échappent pas à la règle. Si la littérature fait déjà état de cela, de nombreuses questions restent toutefois en suspens, tant sur les causes que sur les conséquences de ce phénomène, ainsi que sur sa possible utilisation pour la détection des cancers. A quel moment observe-t-on un changement d'odeur ? Ces modifications d'odeurs peuvent-elles être détectées et induisent-elles une modification de comportement, notamment sexuel, des congénères ? Ce projet vise donc à caractériser les changements d'odeurs survenant au cours du développement des tumeurs, et à étudier le comportement des souris femelles vis-à-vis d'odeurs de souris mâles à différents stades de développement du cancer et

l'impact sur le choix du partenaire sexuel. Pour se faire, comme il est à ce jour impossible de mimer le comportement olfactif d'individus cancéreux, nous aurons recours au modèle animal de type murin. Nous utiliserons 12 souris mâles EGFR génétiquement modifiées qui lors de l'ajout de doxycycline dans leur alimentation développent un cancer et 20 souris EGFR contrôle (wild type), 12 ayant de la doxycycline dans leur alimentation et 8 témoin sans doxycycline. Pour les tests d'habituation/discrimination nous utiliserons 21 mâles Balb C et 21 femelles Balb C pour les tests de préférence sexuelle. Au vu des résultats obtenus lors des tests préalables, pour cette expérimentation en tout 74 souris seront nécessaires, ce qui est en adéquation avec les données de la littérature. Pour le bien-être des individus, les cages d'hébergement présenteront des enrichissements. Les souris mâles EGFR sont isolées pour qu'il n'y ait pas de biais lié à un statut de dominance qui pourrait influencer leurs odeurs. Cependant, ils pourront avoir des interactions visuelles avec leurs congénères. En terme d'enrichissement ils ont uniquement un carré de cellulose dans leurs cages pour ne pas rajouter des odeurs de plastique. Par contre les souris BalbC seront gardées par groupes de 4 ou 5 avec un igloo ou un abri en plastique rouge et un carré de cellulose.

13678 En 2015, plus d'1,9 million d'animaux ont été utilisés à des fins scientifiques dans les établissements de recherche français. Parmi ces animaux, les rongeurs sont majoritairement utilisés (52,9 %, de souris et 8,2% de rats). De fait, la recherche animale est un maillon encore irremplaçable de la recherche biologique fondamentale et appliquée. Les étudiants s'inscrivant dans un parcours de formation en Neurosciences seront pour une majorité d'entre eux amenés à travailler de près ou de loin avec ces modèles rongeurs, aussi bien dans le domaine public (p. ex., Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique) que dans le domaine privé (p. ex., industrie pharmaceutique). Il est donc primordial que ces étudiants prennent conscience des avantages et des contraintes que représente l'utilisation de ces modèles animaux dans le cadre de la recherche en biologie. L'objectif de ce projet est donc de présenter aux étudiants les aspects méthodologiques, éthiques et conceptuels inhérents à la recherche animale. Dans le cadre de ces unités d'enseignement, deux travaux pratiques reposant sur des études comportementales seront proposés. 24 rats adultes Long Evans seront utilisés dans des tests de reconnaissance d'objet. Ce type de test ne nécessite pas de privations particulières (eau et nourriture sont disponibles à volonté tout au long de la période d'expérimentation), et repose donc uniquement sur un comportement exploratoire naturel des individus. Un délai de quatre mois entre les deux tests comportementaux nous permettra d'avoir recours aux mêmes animaux pour les deux protocoles, minimisant ainsi d'éventuels effets d'interférence et nous permettant également de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet. Ces animaux seront hébergés par deux à l'animalerie et bénéficieront d'enrichissement dans leur cage conformément à la réglementation en vigueur. Aucune douleur particulière n'est à prévoir pour ces animaux, le stress de la manipulation par l'expérimentateur sera amoindri par une manipulation préalable durant une semaine avant expérimentation. À la fin de ces TP, les animaux seront réhabilités par l'intermédiaire d'une association dans le cadre du plan national de la retraite des animaux de laboratoire. Cette réhabilitation est conforme aux procédures décrites par l'article R. 214-112 du Code rural et de la pêche maritime.

13679 Les infections à Clostridioides difficile (*C. difficile*) sont un problème de santé majeur, puisque ce pathogène est responsable de 90% des colites pseudo-membraneuses, une pathologie caractérisée par une inflammation très sévère du côlon, des diarrhées parfois sanglantes et des douleurs abdominales. La majorité des infections à *C. difficile* ont lieu après un traitement antibiotique en milieu hospitalier. Certains de ces antibiotiques tels que les pénicillines, les céphalosporines, les fluoroquinolones et la clindamycine sont plus souvent associées aux diarrhées à *C. difficile*. Ces traitements antibiotiques vont perturber le microbiote intestinal ce qui va permettre à des spores de *C. difficile* issus de l'environnement de s'installer dans l'intestin et de s'y développer. Les traitements actuels font appel à des antibiotiques qui ne sont actifs que contre la forme végétative de la bactérie et non contre les spores, ce qui pose des problèmes de résurgence de la maladie dès l'arrêt de la prise de l'antibiotique.

La pathogénicité de cette bactérie fait intervenir des mécanismes complexes avec des interactions entre le pathogène, le microbiote intestinal, et le métabolisme et le système immunitaire de l'hôte. L'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* ne permettant pas de mimer la complexité de ces interactions, le recours à des modèles animaux s'avère nécessaire pour évaluer les effets de l'administration des traitements et décrypter leurs modes d'action.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier dans un modèle d'infection à *C. difficile* chez la souris, l'effet de traitements probiotiques sur des paramètres de l'hôte (inflammation intestinale, diarrhée) et sur son microbiote intestinal.

Certains traitements probiotiques ont démontré leurs efficacités dans des modèles expérimentaux mais leurs mécanismes d'action n'ont pas complètement été décrits.

Les souris étant naturellement résistantes aux infections à *C. difficile*, une administration d'antibiotiques est nécessaire pour déstabiliser leur microbiote intestinal et sensibiliser les souris à l'infection. Une fois les souris sensibilisées, celles-ci sont infectées grâce à une administration orale unique d'une préparation de *C. difficile* pour une colonisation de l'intestin. L'infection va alors pouvoir se développer.

Les traitements par des préparations de probiotiques seront administrés par voie orale. Les effets du traitement seront évalués en curatif ou en préventif c'est-à-dire à différents temps avant et après implantation du pathogène.

Le nombre d'animaux utilisés est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire douze animaux par groupe. Six groupes seront constitués pour chaque condition de traitement étudiée, soit 72 animaux par condition. (a : souris non sensibilisées, non infectées, non traitées ; b : souris non sensibilisées, non infectées, traitées ; c : souris sensibilisées, non infectées, non traitées ; d : souris sensibilisées, infectées, non traitées ; e : souris sensibilisées, infectées et traitées ; f : souris sensibilisées, non infectées, traitées). Ces 6 groupes sont nécessaires à chaque expérience pour avoir les groupes contrôle nécessaires lors de l'analyse des prélèvements.

Au maximum, 15552 animaux seront utilisés pour la durée maximale du projet (5 ans). Ce nombre se décompose de la manière suivante : 12 x 6 groupes x 3 types d'administration d'antibiotiques x 3 préparations de probiotiques x 4 cinétiques de traitements probiotiques x 3 préparations de *C. difficile* x 2 genres = 15552 animaux. Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté (présence de dômes fournissant un abri aux souris et de roues leur permettant de répondre à leur instinct de course), un suivi quotidien de leur bien-être et l'application de points limites pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Durant la procédure, des prélèvements sanguins sur les animaux se feront sous anesthésie afin de réduire l'inconfort et le stress des animaux. Les animaux seront placés sur des tapis chauffants lors de l'anesthésie pour éviter une hypothermie. Le temps d'anesthésie est également réduit grâce à l'administration d'un antidote permettant d'annuler les effets de l'anesthésiant et ainsi de faciliter le réveil de l'animal.

13680 La dialyse est un traitement de purification du sang couramment utilisé par plus de 35 000 personnes en France. Cette méthode de soins consiste en l'épuration extra-corporelle du sang, chez un patient vigile. Elle est sans douleur pour le patient humain ou animal. Les séances sont répétées régulièrement chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Afin d'améliorer l'efficacité des séances de dialyse, il est nécessaire de faire progresser le matériel utilisé et les modalités de réalisation des séances. Les appareillages sont complexes et un grand nombre de paramètres entrent en ligne de compte. Il est possible de gérer la plupart de ces éléments par des mesures physiques classiques. En revanche, l'inocuité d'un nouveau dispositif complet de dialyse, en particulier si on utilise de nouvelles membranes filtrantes, nécessite de faire des essais sur animaux, avant de pouvoir les utiliser chez des malades humains. Ainsi, il est indispensable de tester les nouveaux matériaux et nouvelles stratégies de dialyse dans des modèles qui se rapprochent le plus possible de l'homme. Les moutons, qui représentent une masse corporelle et

un volume sanguin identiques à ceux de l'homme les meilleurs modèles pour mettre au point, valider et contrôler les dispositifs de dialyse. Sur les cinq prochaines années, notre plate-forme de dialyse devrait utiliser 60 moutons au maximum. C'est le nombre estimé le plus élevé de moutons qui nous sera nécessaire si la demande de test et mise au point de membranes de dialyses est importante. Les moutons sont acquis par le laboratoire longtemps à l'avance et maintenus à l'extérieur dans un pré, comme tout mouton de ferme. Ils sont également maintenus au pré entre deux séances de dialyse, en troupeau équilibrés. Avant les dialyses, les moutons sont habitués pendant plusieurs jours à la salle dans laquelle elle se déroule. Le mouton dialysé est debout, libre de ses mouvements. Il est toujours accompagné d'un congénère pour limiter le stress qui serait provoqué par un éventuel isolement. Ils sont soignés par du personnel formé et surveillés pour les éventuelles conséquences de dialyses, à long terme par une équipe de vétérinaire qualifiés. L'expérience est longue, elle peut durer jusqu'à 3 heures d'affilée, mais elle n'est pas douloureuse. Les animaux ont à boire et à manger à volonté pendant toute la séance et en général, n'éprouvent pas de stress majeur, du fait de la présence de compagnons.

13681 Les pathologies cardiovasculaires représentent les principales causes de morbidité et de mortalité chez le patient insuffisant rénal chronique (IRC). Environ 50% des décès chez ces patients sont dus à un événement cardiaque majeur, tels que le syndrome coronarien aigu, l'insuffisance cardiaque à fonction ventriculaire gauche préservée ou altérée, les arythmies, et la mort subite. L'atteinte cardiovasculaire est observée à des degrés variables dès les premiers stades de l'insuffisance rénale chronique. Le syndrome cardio-rénal est un chevauchement entre dysfonction rénale et cardiaque.

Au niveau cardiaque, l'hypertrophie du ventricule gauche représente l'élément majeur impliqué dans ce syndrome. Elle est associée à une augmentation pathologique du dépôt des fibres de soutien dans le tissu (fibrose) et à une altération de la relaxation et de la contraction du cœur pouvant aboutir à une insuffisance cardiaque. La dysfonction diastolique (relaxation cardiaque), la fibrose et l'hypertrophie apparaissent comme des facteurs indépendants et prédictifs de la survenue d'évènements cardiovasculaires dans l'insuffisance rénale chronique.

Une perte de fonction et une réduction de masse au niveau musculaire est également associée à l'insuffisance rénale chronique. Environ 50% des patients insuffisants rénaux sont affectés par cette myopathie dite urémique. L'atteinte des muscles entraîne une faiblesse musculaire et une incapacité à se déplacer. Cette myopathie urémique est corrélée avec une augmentation de la mortalité et de la morbidité. De plus, de nombreux patients, à des stades avancés d'insuffisance rénale chronique, sont affectés par une atteinte des nerfs périphériques (neuropathie périphérique), également connue sous le nom de neuropathie urémique. Les complications neurologiques les plus fréquentes sont des symptômes tels que la douleur, la perte de sensation et la faiblesse. Dans les cas avancés, les nerfs moteurs peuvent être affectés entraînant une faiblesse et une atrophie des muscles. A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation de la dysfonction musculaire et neuro-musculaire dans l'insuffisance rénale chronique ainsi qu'aux mécanismes moléculaires à l'origine de ces anomalies cliniques.

Notre projet a pour but d'étudier de manière parallèle et au cours du temps les mécanismes de l'atteinte cardiaque et musculaire, de comprendre leur développement et de rechercher des acteurs et/ou des marqueurs de l'interaction entre ces deux systèmes musculaires dans l'insuffisance rénale chronique.

Cette étude sera réalisée sur un modèle de rat présentant une insuffisance rénale chronique obtenue par une réduction de la masse rénale étudiée au cours du temps pour mimer les différents stades de la maladie observés chez l'homme.

Cette étude sera réalisée sur un total de quatre-vingt-seize (96) rats, étudiés en deux séries de 48 rats. Les mesures seront faites 2, 4, 8, 12 et 24 semaines après initiation de la pathologie. L'insuffisance rénale chronique sera induite par une réduction de la masse rénale (RMR), modèle de référence pour cette pathologie.

Pour réduire le nombre d'animaux et donner plus de puissance aux analyses, un lot de 6 RMR et 6 Témoin sera suivi pendant les 24 semaines et aura des échocardiographies aux temps basal (t0) et aux 5 temps d'observation. Ils compléteront les groupes de rats ayant également une échographie et mis à mort à chaque temps pour le prélèvement d'organes. A chacun des cinq temps, il faudra huit (8) rats RMR et huit (8) rats Témoin. Au temps 24 semaines, on peut estimer une mortalité de 20% chez les rats RMR, ce qui nécessite de prévoir 4 rats supplémentaires. C'est donc un total de 96 rats qui seront utilisés (46 Témoins et 50 RMR).

Afin de raffiner notre méthodologie, les rats feront l'objet d'une surveillance journalière avec la mise en place d'astreintes pour les samedis, dimanches et jours fériés. Le poids des animaux sera suivi toutes les semaines et les signes de souffrance seront recherchés. La cage comprendra une litière avec copeaux dans un environnement enrichi. L'étude portant sur le développement d'une maladie chronique et sur l'interaction entre différents organes, le modèle animal ne peut être remplacé.

13682 Le diabète de type 2 est considéré comme une véritable épidémie qui affecte près de 400 millions de personnes dans le monde. Cette pathologie est devenue un facteur de morbi-mortalité majeur favorisé par le développement de l'obésité, du fait notamment d'une modification des habitudes alimentaires (alimentation hypercalorique) et d'un mode de vie plus sédentaire, en particulier dans les pays émergents. Actuellement, différentes approches thérapeutiques sont disponibles pour traiter le diabète de type 2, d'abord en monothérapie, puis par des associations de médicaments ayant des mécanismes d'action différents. Toutefois chacun des produits est susceptible d'induire des effets indésirables survenant à plus ou moins long terme. Il est donc important, dans ce contexte concurrentiel, de développer des nouveaux traitements entraînant le moins possible d'effets indésirables, notamment grâce à des molécules d'origine naturelle telles que les polyphénols alimentaires ou leurs métabolites circulants.

Des études préliminaires réalisées grâce à des méthodes alternatives (lignées cellulaires) nous ont permis de sélectionner des molécules d'origine naturelle (polyphénols ou métabolites de polyphénols) au potentiel antidiabétique.

L'utilisation d'un modèle animal reste néanmoins le seul moyen aujourd'hui pour évaluer l'effet antidiabétique de molécules particulièrement prometteuses *in vitro*.

Notre objectif sera donc d'étudier, chez des souris diabétiques, l'activité antidiabétique de ces nouvelles molécules. Celles-ci seront administrées pendant 8 semaines dans la nourriture et seront testées seules ou en association avec un médicament antidiabétique de référence utilisé en thérapeutique.

Ce projet impliquera l'utilisation de 490 souris sur une durée de 5 ans.

13683 Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament pendant son développement pré-clinique. Conformément à la ligne directrice " ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals ; EMA/CPMP/ICH/286/1995 ; December 2009", la réalisation de ce projet est indispensable pour chaque nouveau candidat médicament avant de démarrer les essais cliniques chez l'homme, et avant toute autorisation de mise sur le marché. Le candidat médicament testé peut aussi être destiné aux soins vétérinaires.

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

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

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

Ce projet consiste en 2 procédures qui englobent toutes les études nécessaires au développement préclinique d'un candidat médicament chez le chien, le chat ou le miniporc (études préliminaires, subchroniques et chroniques) ; la durée des études varie de 1 jour à 52 semaines (ou plus si jugé nécessaire par les Autorités), par la voie d'administration et selon le même schéma de traitement utilisés en clinique. Toutes les études seront conduites dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs (remplacement, réduction et raffinement).

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

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet varie selon le protocole expérimental et est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes et de respecter les lignes directrices en vigueur. Il est attendu d'utiliser au maximum 1896 animaux sur la durée du projet (3 ans).

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

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

Depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, l'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter tout inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

13684 Le cancer du pancréas est la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace, l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à développer de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement de cancer du pancréas. La nanomédecine est une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité thérapeutique, et en même temps, de réduire la toxicité et surmonter la résistance aux médicaments.

Après une étude minutieuse *in vitro*, une nano-formulation de rapamycine par les dendrimères amphiphiles a été sélectionnée et s'est avérée très efficace pour tuer différentes cellules cancéreuses. Plus important encore, il est capable d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses résistantes aux médicaments, qui sont par ailleurs difficiles à traiter. Il est primordial de tester *in vivo* l'efficacité de cette nano-formulation rapamycine/dendrimère qui pourraient être utilisés dans le combat contre le cancer du pancréas.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine. Dans ce but, des souris xénogreffes de tumeur du pancréas seront utilisées pour tester *in vivo* l'efficacité de cette nano-formulation rapamycine/dendrimère afin d'évaluer son potentiel dans le combat contre le cancer du pancréas.

Dans ce projet, nous injecterons des cellules cancéreuses pancréatique humaine B-TIM à des souris NSG afin de générer des xénogreffes sous-cutanée qui seront ensuite utilisées pour évaluer cette nano-formulation, suite injection intraveineuse deux fois par semaines pour une durée de 4-8 semaines selon les résultats de traitement.

Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Nous avons tenté d'utiliser toutes les méthodes substitutives possibles notamment les approches cellulaires, mais nous ne pouvons pas nous passer du recours à l'animal. Nous réduirons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de tests statistiques permettant d'optimiser la taille des effectifs, et nous raffinerons les procédures en diminuant autant que possible le stress et la douleur des animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet est estimé à 92 souris. L'implantation des tumeurs comme le traitement et la procédure d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale en gazeuse afin de réduire le stress et la douleur des animaux. Nous utiliserons des doses à faible impact neurologique afin de préserver le bien-être des animaux tout en évaluant l'efficacité et la bio-distribution de notre nano-formulation rapamycine/dendrimère.

Un délai d'acclimatation minimum de 7 jours et une habitude à l'expérimentateur seront assurés pour les animaux. Le raffinement portera également sur les conditions d'hébergement (groupes sociaux, cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum) et l'enrichissement environnemental. Les souris seront hébergées dans des cages contenant des rondins de bois à ronger et un refuge afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, recherche de cachette...). Un examen quotidien permettra de suivre l'état général des souris. Des points limites et des grilles de score sont prévus et seront suivis afin de garantir le bien-être animal. Une échelle clinique adaptée au modèle tumoral d'implantation sous-cutanée permettra de suivre chaque animal et de détecter des signes de souffrance (voir annexe I). Les animaux seront soit mis à part pour récupérer l'état normal soit euthanasiés dès qu'ils atteindront un score clinique limite, ou qu'un signe clinique critique tel que défini dans l'échelle clinique en annexe I est atteint.

13685 Nos modes de vie (diagnostics médicaux) et la survenue d'événements exceptionnels, tels que des accidents nucléaires ou des attaques terroristes radiologiques, représentent un risque pour les populations exposées aux rayonnements ionisants (RI) qu'il est important d'évaluer. Il existe encore peu d'études sur les effets de ce type d'exposition, à doses faibles ou modérées, sur les fonctions cérébrales chez l'homme. Certaines d'entre elles suggèrent malgré tout qu'une exposition externe aux RI, pendant l'enfance, pourrait entraîner l'apparition de troubles cognitifs persistants à long terme chez l'Homme. Ce domaine de recherche a fait l'objet de peu d'études par la communauté scientifique. Le but de nos études expérimentales est d'évaluer les troubles cognitifs susceptibles de survenir suite à une exposition externe du cerveau à des doses de RI faibles à modérées et de comprendre les mécanismes sous-jacents à ces troubles. Dans nos précédents projets, un modèle d'irradiation du cerveau entier vs un modèle d'irradiation localisée du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, particulièrement impliqué dans la cognition, ont été utilisés afin d'étudier l'effet des RI (gamme de dose 0.25, 0.5, 1 et 2 Gy). Nos études précédentes ont permis d'évaluer l'effet de ces expositions sur les fonctions du comportement et certains des mécanismes cellulaires qui pourraient être impliqués dans les altérations fonctionnelles observées, 3 mois après l'exposition. Nous souhaitons désormais compléter ces données par l'étude du volume du cerveau et des structures cérébrales. La réalisation d'images par imagerie par résonance magnétique (IRM), 3 mois après l'exposition sera nécessaire dans ce projet afin d'évaluer si les troubles observés sont en lien avec un développement cérébral anormal. Les doses d'exposition utilisées dans cette étude expérimentale ne doivent pas engendrer de souffrance chez les animaux.

Pour la réalisation de cette étude 180 souris mâles âgées de 10 jours seront utilisées sur une période de 5 ans. L'approche expérimentale que nous souhaitons mettre en place nécessitera, pour dose d'irradiation de 1 Gy, l'utilisation de trois groupes d'animaux (champ large du cerveau vs irradiation localisée vs contrôles). De nouvelles réponses scientifiques quant aux mécanismes biologiques sous-tendant ses troubles ainsi que la manière dont les RI impactent le cerveau ou une sous structure cérébrale en développement seront alors apportés. Afin de répondre au type de questions scientifiques soulevées dans ce projet et de pouvoir mettre en perspective ces nouvelles données avec les résultats précédemment obtenus, il n'existe pas de test *in vitro* substitutif. Dans l'objectif de répondre à l'exigence des 3R nous choisirons pour chaque expérimentation un nombre

d'animaux permettant d'avoir une bonne puissance statistique pour obtenir des résultats scientifiques robustes sans avoir à effectuer de nouvelles expérimentations.

Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum l'inconfort ou le stress chez les animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, anesthésie des animaux pendant l'irradiation et l'imagerie, hébergement en groupe avec enrichissement, maintien au chaud des animaux suite à anesthésie).

13686 Avant de réaliser des essais chez l'homme, il est indispensable d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament par l'intermédiaire d'études précliniques. Les études précliniques font en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est primordiale pour avoir une meilleure connaissance d'un futur médicament avant d'envisager son administration chez l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de caractériser sur son efficacité, sa toxicologie et son comportement pharmacocinétique. Toutes ces études permettront ensuite de constituer une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament. Il est donc indispensable de réaliser ces études pour envisager d'offrir un nouveau panel de médicament aux patients.

Ces dernières années le développement de nouvelles approches d'immunothérapie des cancers a apporté un progrès considérable dans la prise en charge thérapeutique de certaines pathologies tumorales, telles que certains cancers de la peau (mélanome) et du poumon (NSCLC) par exemple. L'une des avancées majeures a été le développement d'anticorps monoclonaux (mAb) thérapeutiques ciblant le récepteurs PD-1 ou son ligand PD-L1 exprimé à la surface des cellules tumorales. Ces nouveaux médicaments biologiques – 5 mAbs anti-PD(L)1 sont actuellement commercialisés – ont permis d'améliorer considérablement la prise en charge de certaines tumeurs solides, attestant ainsi de la pertinence de la cible thérapeutique et du bienfondé de l'approche médicamenteuse. Cependant, les taux de réponses sont souvent limités (30 à 50% au mieux), les rechutes fréquentes et l'utilisation de ces produits injectables est contraignante, limitant notamment les possibilités de combinaisons thérapeutiques ou l'accès à certains organes (tumeurs cérébrales). Des effets secondaires néfastes, notamment ceux affectant le système endocrinien (thyroïde), sont souvent observés. Par ailleurs, ces médicaments biologiques sont excessivement chers pour les agences de santé. Les coûts de production des mAbs sont bien plus élevés que ceux des petites molécules, en règle générale. Pour pallier à ces limitations, des petites molécules ciblant le même effecteur immunologique PD1/PDL1 sont actuellement développées. Le projet présenté s'inscrit dans cette démarche et vise à développer une nouvelle famille de composés récemment identifiés (et brevetés) ciblant très sélectivement le ligand tumoral PD-L1.

Le but de ce projet étant d'étudier l'effet de nouveaux traitements potentiels sur la réponse anti-tumorale dans des modèles animaux mimant différentes formes de cancer chez la souris.

Pour ce projet nous pensons effectuer 4 modèles tumoraux ce qui représente l'utilisation de 450 animaux sur 5 ans. En conclusion, ce projet permet d'envisager des bénéfices cliniques et économiques évidents.

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

- « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.
- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement.
- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites de souffrance.

13687 L'arthrose est une pathologie qui, dans les pays aux populations vieillissantes, constitue un véritable problème de santé publique. Elle affecte entre 10 et 15 millions de personnes en France et les personnes âgées sont les plus exposées avec 70% des plus de 65 ans présentant des signes d'arthrose. Cette pathologie affecte essentiellement les genoux, les mains, les hanches et les étages lombaires et cervicaux de la colonne vertébrale.

Actuellement, parmi les différentes solutions thérapeutiques existantes, aucune ne permet de traiter ou d'endiguer le processus arthrosique. La prise en charge des patients associe un traitement non-pharmacologique (rééducation, orthèse, semelle régime amaigrissant...) à un traitement pharmacologique. Les traitements proposés permettent essentiellement de traiter les symptômes douloureux de l'arthrose (analgésiques et anti-inflammatoires). Aujourd'hui, l'enjeu des recherches consiste, notamment, à trouver des traitements ciblant les origines moléculaires de l'arthrose en s'intéressant notamment à la composante inflammatoire de la maladie. C'est pourquoi les recherches se tournent vers le développement de traitements préventifs de type compléments nutritionnels.

Dans le cadre du développement d'une utilisation d'actifs nutritionnels dans la prévention de l'arthrose, il semble essentiel de déterminer les effets de ces composés au niveau articulaire, après leur ingestion et digestion *in vivo*. Le modèle d'arthrose que nous avons choisi est un modèle induit chirurgicalement par déstabilisation médiale du ménisque (DMM). Ce projet vise donc à étudier, dans le contexte articulaire, les effets de compléments nutritionnels. L'administration des extraits à tester à ces modèles animaux sera effectuée par voie orale en supplémentation de l'alimentation

La procédure expérimentale n°1 consistera en l'évaluation de la prise alimentaire des croquettes supplémentées en compléments nutritionnels afin de garantir la prise journalière adéquate des actifs nutritifs. Des croquettes seront spécialement fabriquées à partir de l'aliment de base (BASE) utilisé au sein de l'animalerie. Ainsi, 2 types de Croquettes seront produites :

-BASE-A : Les croquettes aliments de base (AB) supplémentées en composé A à raison de 2mg de A/ 5g de Croquette soit 400 mg de A /Kg de croquettes

-BASE-B : les croquettes aliments de base (AB) supplémentées en composé B à raison de 10 mg de B/ 5g de Croquettes soit 2g de B /kg de croquettes.

Afin d'évaluer si la modification des croquettes avec les compléments nutritionnels A et B ne modifie pas le volume de la prise alimentaire, 15 souris C57BL/6 mâles seront réparties en 3 groupes A, B et C. La prise alimentaire des souris sera suivie pendant 2 semaines par une pesée des aliments avant et après la prise alimentaire, ainsi qu'une pesée des souris tous les 2-3 jours afin de s'assurer qu'elles prennent bien la dose requise de chaque aliment.

La procédure expérimentale n°2 aura pour objectif d'évaluer l'impact de ces compléments nutritionnels dans l'apparition et l'évolution de l'arthrose. Une arthrose post traumatique sera donc induite chirurgicalement par DMM chez des souris C57BL/6 mâles (48 souris). Les souris seront nourries avec les croquettes supplémentées ou non décrites précédemment dans la procédure n°1. Les souris seront ainsi réparties en 4 groupes de 12 souris. 12 semaines après induction de l'arthrose, les souris seront euthanasiées et le niveau d'arthrose sera évalué par analyses microscanner, histologiques et immunohistochimiques.

Ces analyses prennent en compte la règle des 3R : le

-Je réduis le nombre d'animaux en validant d'une part que les souris prennent bien la dose correcte d'aliments modifiés, en cas de prise alimentaire incorrecte, la procédure n°2 sera invalidé en l'état et devra faire l'objet d'une modification qui nécessitera le dépôt d'une nouvelle saisine. De plus, le nombre d'animaux par groupe correspond au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique (soit 5 animaux par groupe pour la procédure expérimentale n°1 et 12 animaux par groupe pour la procédure expérimentale n°2) cette saisine nécessitera donc 63 souris C57BL/6 mâles.

-Je raffine en réduisant la douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Ainsi, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine en pré et post-chirurgie ainsi que l'ajout de meloxicam dans l'eau de boisson pendant 3 jours post-chirurgie. Les souris seront hébergées à raison de 4 souris par

cages. Elles seront observées et pesées quotidiennement la première semaine après la chirurgie puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites.

-Malheureusement, je ne peux pas remplacer cette expérimentation animale par un modèle *in vitro*, car cette étude visant à déterminer l'effet de suppléments alimentaires sur l'apparition et l'évolution de l'arthrose nécessite l'intervention du système digestif et de l'articulation dans son ensemble ce qui ne peut pas être reproduit *in vitro*. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux pour ce projet.

13688 La production d'anticorps polyclonaux est un projet d'immunisation consistant à la production d'un nouvel anticorps grâce à l'utilisation de peptides innovants. Les anticorps produits seront utilisés notamment en recherche, en médecine, pour la réalisation de test de diagnostic...

La production d'anticorps polyclonaux consiste à produire des anticorps par injection à un animal d'un antigène cible, associé le plus souvent à un adjuvant dans le but d'amplifier la réponse immunitaire. Des injections de rappels de l'antigène peuvent avoir lieu pour obtenir une réponse humorale plus importante.

Suite aux administrations, des réactions locales (gonflement, abcès...) et générales (augmentation de la température corporelle, perte de poids, diminution d'activité...) peuvent être observées. De plus, des prélèvements de sang réguliers sont effectués pour évaluer le titre d'anticorps et obtenir les anticorps polyclonaux recherchés. Dans certains cas, les animaux peuvent être euthanasiés suite au prélèvement de la quasi totalité du volume sanguin circulant effectué sous anesthésie.

La production d'anticorps polyclonaux nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'il n'existe aucune méthode substitutive pour cette production. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. En effet, de 1 à 8 animaux pourront être immunisés par étude selon les besoins. 200 caprins ou 200 ovins pourront donc être utilisés sur 5 ans.

Dans le cadre de ces études, afin de permettre aux animaux inclus de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation d'au minimum 7 jours sera dispensée avant traitement. De plus, tout au long de leur hébergement, les animaux disposeront de conditions d'hébergement adaptées et vérifiées quotidiennement. Ainsi, ils bénéficieront d'un logement, d'un environnement, d'une alimentation, d'un apport en eau et en soins appropriés à leur santé et à leur bien-être. Dans cette optique, dans le cas où 1 animal est inclus par étude, il sera hébergé avec au minimum un autre de ses congénères et/ou avec d'autres espèces compatibles, dans un environnement enrichi.

Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner et de le soulager.

13689 L'adénocarcinome du pancréas humain (PDAC) est l'un des cancers les plus redoutables et meurtriers dans le monde. Il représente la quatrième cause de décès par cancer au niveau mondial. En l'absence de progrès dans sa prise en charge, les données actuelles prédisent que le PDAC sera la seconde cause de mortalité par cancer en 2030. Le taux de survie ne dépasse pas 20% à 1 an avec une moyenne de survie de 3 à 4 mois après le diagnostic. L'une des raisons des échecs thérapeutiques est la présence d'un environnement immunosuppresseur très fort, due à l'activation de cellules particulières du système immunitaire qui vont favoriser le développement de la tumeur au lieu de la combattre. Ces cellules, principalement les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), sont des acteurs clés dans l'échappement tumoral du PDAC, et leur ciblage est de plus en plus exploré dans des approches thérapeutiques.

Objectif du projet: il consistera à identifier et caractériser des interactions physiques entre les MDSC et les Treg au sein d'une tumeur pancréatique développée dans un modèle de souris C57bl/6J de cancer du pancréas.

Avantages du modèle et dommages attendus pour l'animal: Ce modèle animal de cancer du pancréas consistera en une injection de cellules tumorales pancréatiques de souris de la lignée Panc02 dans le pancréas d'une souris C57bl/6J pour développer une tumeur pancréatique. Ce modèle va nous permettre de reproduire les caractéristiques de l'environnement tumoral et immunitaire, en particulier la mise en place par la souris, d'un environnement immunosuppresseur au sein de la tumeur, au travers de la production et l'activation de MDSC et Treg, reflétant ainsi ce qui peut se passer chez les patients. Ce modèle va nous permettre de confirmer l'identification et la caractérisation des interactions entre les MDSC et les Treg permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'échappement tumoral et de bloquer ces mécanismes pour permettre une réactivation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

Nombre total d'animaux utilisé: il sera de 60 souris C57bl/6J incluses dans une seule procédure expérimentale qui consistera à déterminer la cinétique de pénétration dans la tumeur des MDSC et Treg et la mise en place des contacts entre ces 2 sous-populations cellulaires. 2 séries de 12 souris seront implantées en orthotopique avec les cellules tumorales pancréatiques de souris Panc02 pour initier la formation d'une tumeur pancréatique. 3 tumeurs seront prélevées par série chaque semaine pendant les 4 premières semaines. 3 souris naïves serviront de contrôles dans chaque série. Les tumeurs de la première série seront analysées par microscopie à feuillet de lumière et les tumeurs de la deuxième série seront analysées par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les cellules du système immunitaire. Ce protocole sera reproduit une fois pour obtenir des valeurs statistiques.

Conformité avec les exigences des 3R:

1. Réduction: Dans un souci de réduire la quantité d'animaux, le nombre par groupe a été minimisé. Il se justifie par le fait d'avoir assez de matériels tissulaires pour réaliser les différentes expériences *in vitro*, gommer les différences inter-individuelles et obtenir des résultats statistiquement exploitables (utilisation du test non-paramétrique de Mann-Witney).

2. Remplacement: Ce modèle animal ne peut être remplacé car il va nous permettre de reproduire un environnement tumoral immunosuppresseur, en particulier la production par la souris de cellules MDSC et Treg dont les interactions seront étudiées *in vitro*.

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

- Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et la nourriture.
- Les animaux seront toujours répartis par groupe de 3 à 5 auquel sera ajouté de l'enrichissement (tunnel/maison en carton, coton/papier) dans toutes les cages.
- Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale par sévofluorane associés à un traitement antalgique pré et post-opératoire.
- Les prélèvements des tumeurs seront réalisés au bout de 1, 2, 3 et 4 semaines de développement tumoral. Les expérimentations réalisées par le passé sur ce modèle ainsi que les données de la bibliographie montrent que la tumeur pancréatique se développe et reste localisé au niveau du pancréas pendant cette période.
- Durant la période de croissance tumorale, les signes comportementaux seront surveillés pour éviter tout développement d'une souffrance animale. Une grille d'évaluation de la douleur sera utilisée selon les critères suivants:
 - Paramètres physiologiques: mesure bihebdomadaire du poids de l'animal et de la prolifération tumorale.
 - Comportement (observation quotidienne): dynamisme et postures de l'animal (postures générale et faciale, comportement exploratoire).
 - Apparence physique externe (observation quotidienne): aspect de la peau (cicatrisation de la plaie chirurgicale suite à la greffe orthotopique, blessure, morsures), et sur un plan général (déshydratation, abdomen creux, troubles urinaires ou défécatoires, consistance et quantité des selles).
- Si un comportement de souffrance est observé, un antalgique sera administré. Afin d'éviter tout développement d'une souffrance animale, les animaux seront euthanasiés dès que la perte de poids

atteindra 20% du poids initial de l'animal (point limite). Si un comportement de souffrance, déterminé selon la grille d'évaluation (valeurs situées entre 4 et 9) est observé durant cette période, un antalgique (buprénorphine 0,05-0,1mg/kg en s. c) sera administré associé à l'arrêt du traitement. Si les signes persistent au delà de 4 jours ou si le score dépasse 9, l'arrêt de l'expérimentation sera réalisé immédiatement par euthanasie de l'animal.

- Les euthanasies seront réalisées par dislocation cervicale sous anesthésie générale dans une pièce d'expérimentation isolée des pièces d'hébergements et de ses congénères.

13690 Dans le cadre de la fabrication de médicaments contenant de l'insuline pour le marché Russe, un test d'identité du produit doit être réalisé sur lapins. Cet essai permet de vérifier l'activité hypoglycémique du médicament après son injection à un groupe de lapins, en comparaison avec une solution d'insuline de référence injectée à un groupe témoin de lapins. La glycémie est ensuite mesurée dans différents échantillons de sérum prélevés à différents temps après l'injection.

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

La quantité d'animaux utilisés est estimée à 72 lapins par an, soit 360 lapins pour la durée du projet : test de 9 lots par an environ, avec 8 lapins par lot.

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

13691 Pour élaborer des comportements sociaux adaptés, un animal doit intégrer des informations diverses provenant du corps et de l'environnement. Il doit simultanément évaluer les différentes possibilités qui s'offrent à lui, tout en tenant compte de ses expériences préalables ainsi que de ses motivations et de ses capacités. Le cortex préfrontal intervient dans une grande partie de ces fonctions supérieures, caractéristiques des comportements sociaux. Malheureusement, nos connaissances sur les gènes potentiellement impliqués dans le contrôle de ces fonctions viennent principalement d'études chez les patients. Or, pour évaluer le rôle d'un gène dans une fonction précise, il est nécessaire de modifier son expression dans des individus naïfs.

Les primates non humains ont développé des comportements sociaux très complexes et cette évolution est associée à une plus grande diversité anatomique et fonctionnelle des régions préfrontales dans leur cerveau. Ils sont donc des modèles animaux de choix pour comprendre la contribution des gènes candidats à des fonctions sociales complexes comme la coopération.

Depuis 5 ans, des nouvelles technologies permettent une manipulation ciblée du génome grâce à l'utilisation d'une famille spécifique de nucléases bactériennes (enzymes connues sous le nom de Cas9). Bien que ces techniques sont applicables à n'importe quel génome, ils ont été essentiellement utilisées chez les rongeurs. L'objectif de ce projet est d'évaluer la faisabilité de l'approche Cas9 pour éliminer un gène d'intérêt dans le cortex du marmouset.

Pour ce faire, nous utiliserons des injections ciblées de vecteurs viraux adéno-associés (sans aucun risque biologique) contenant tous les éléments nécessaires à l'inactivation d'un gène (miR-124) que nos travaux préalables ont identifié comme essentiel pour les comportements sociaux chez la souris. miR-124 n'est pas un gène codant et sa suppression (même dans quelques milliers de cellules) ne devrait pas engendrer des conséquences négatives pour l'animal. Après injection, les animaux seront mis à mort à différents temps post-injection et les niveaux d'expression du gène cible évalués afin de vérifier l'inactivation. L'accès à cette technologie va nous offrir l'opportunité unique de pouvoir modifier sur demande un gène d'intérêt et va contribuer, dans un premier temps, à une meilleure compréhension du contrôle génétique associé aux fonctions sociales complexes chez le primate. Ces connaissances seront d'une grande utilité et pourrait être extrapolées à l'homme et à certaines maladies altérant son comportement social.

REMPACER

Ce type d'études nécessite un modèle animal puisque les méthodes de remplacement (e. g. culture cellulaire) ne permettent pas d'évaluer les fonctions cérébrales supérieures (donc inutilisables chez l'humain). D'une manière générale les modèles de primate non humain sont nécessaires en neurosciences intégratives pour des raisons de proximité anatomiques, physiologiques et de comportement social avec l'Homme. Contrairement aux rongeurs, les aires corticales supérieures, en particulier celles du cortex préfrontal, sont très développées chez les primates non humains, y compris chez les marmousets.

REDUIRE

Nous allons limiter à 8 marmousets le nombre d'individus à utiliser pour ce projet. Dans les publications impliquant des primates non humains, chaque résultat doit être obtenu au moins 2 fois, et préférentiellement 3 fois pour être considéré comme valide. Etant donnée la difficulté des expériences entreprises, nous estimons qu'il nous faudrait un minimum de 2 animaux pour les tests préliminaires et 4 pour obtenir les résultats. Si, avec ce nombre, nous ne sommes pas en mesure d'obtenir un résultat satisfaisant, nous concluons que l'approche n'est pas utilisable chez le primate non humain.

Il est important de noter que nous profiterons de préliminaires obtenus dans le cadre d'un autre projet et qui nous serviront pour diminuer les tests sur ce projet. Nous utiliserons pour nos expériences, si possible, des animaux qui ont été isolés suite à des conflits dans un groupe familial. Il est aussi nécessaire de mentionner que lors des anesthésies nécessaires aux chirurgies, nous réaliserons de prélèvements des poils du dos avec le bulbe afin d'extraire l'ADN génomique ce qui permettra de mettre au point la caractérisation génétique de notre colonie de marmousets. Ceci permettra sur le long terme d'optimiser le choix des animaux pour certains tests expérimentaux dans d'autres projets.

RAFFINER

Les prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront systématiquement selon des procédures validées par le vétérinaire. Pour les chirurgies, nous utiliserons une anesthésie locale aux points d'ouverture de la peau en plus d'une anesthésie générale. A la suite d'une injection de vecteurs, les périodes de survie post-chirurgie sont assez longs pour permettre la réintégration de l'animal dans son groupe familial.

13692 Contexte : L'obésité et le diabète de type 2 sont des pathologies métaboliques humaines en pleine expansion et il est important d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques afin de proposer des solutions thérapeutiques efficaces.

Objectifs : Dans la cellule du foie, la mitochondrie, une structure importante pour la production d'énergie, et le réticulum, une autre structure servant entre autre de réservoir de calcium, semblent pouvoir communiquer notamment pour échanger des informations dans le contrôle de l'action de l'insuline. Notre projet a pour objectif général de mieux comprendre le rôle de ces communications et leur possible dérégulation lors de troubles du métabolisme comme le diabète de type 2 et l'obésité. Nous travaillerons avec des modèles murins d'obésité (souris leptine-déficientes) et de diabète (souris soumises à un régime riche en gras et en sucre pendant 4 mois). Nous étudierons par des méthodes non-invasives la sensibilité de ces souris au glucose et à l'insuline. Par ailleurs, nous chercherons à mieux comprendre le mécanisme d'altération des communications entre réticulum et mitochondrie par une technique innovante d'imagerie sur des cellules de foie de souris. Cette demande concerne donc l'isolement d'hépatocytes par prélèvement du foie de différents modèles de souris. Ce projet comporte donc 4 procédures pour un total de 197 souris sur 5 ans.

Conformité de la règle des 3R :

Remplacement : Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire afin d'avoir un modèle murin intégré qui permet d'étudier le métabolisme et ses altérations. De plus, celui-ci s'appuie sur des résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires.

Réduction : Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit au maximum 197 animaux sur 5 ans. Afin d'optimiser

le recours aux animaux, ces derniers participent à plusieurs protocoles tout en veillant à minimiser au maximum la gêne et l'angoisse que cette succession de protocoles (pas ou peu invasifs) pourrait induire. De plus, le prélèvement d'organes autre que le foie, à savoir muscle et cœur, sera réalisé pour d'autres études au sein de notre laboratoire.

Raffiner : Les conditions d'hébergement des souris sont optimisées pour assurer un confort des animaux dès leur arrivée (enrichissement, respect des groupes sociaux, soins et suivi post-injections). Afin de limiter tout risque de souffrance ou de mal être pour l'animal, l'injection de virus et la perfusion du foie sont entièrement réalisées sous anesthésie générale. Enfin, lors des prélèvements finaux, d'autres tissus pourront être prélevés et conservés en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la mise en place du projet afin de limiter, optimiser et valoriser au mieux les prélèvements et le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

13693 Les infections des volailles par certains Alphainfluenzavirus ou certains Avulavirus aviaires de type 1 sont considérées réglementairement comme des dangers sanitaires de 1^{re} catégorie : respectivement influenza aviaire et maladie de Newcastle, pour lesquels un plan national d'intervention sanitaire d'urgence et des mesures de surveillance, de prévention et de gestion doivent être mises en place par les autorités sanitaires. La surveillance de ces maladies chez les volailles repose sur la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic officialisées ou reconnues par le ministère de l'Agriculture, pour lesquels un processus de caractérisation, de validation et de contrôle avant usage est réglementairement nécessaire. Certaines étapes de ce processus telles que la caractérisation des performances diagnostiques des méthodes utilisées nécessitent (conformément aux recommandations d'organismes internationaux scientifiquement reconnus comme l'Office international des épizooties) de disposer d'échantillons ou de matériaux de référence de statut et d'origine connus.

L'objectif de ce projet est de constituer une telle collection d'échantillons de référence, après inoculation contrôlée de virus influenza aviaires ou d'Avulavirus aviaires (sélectionnés en fonction de leurs caractéristiques épidémiologiques) chez quatre espèces de volailles d'intérêt économique et épidémiologique en France : poule, dinde, canard de Barbarie et canard mulard.

Les procédures seront conduites pour chaque virus sur 40 animaux au total (10 sujets de chaque espèce) et quatre virus différents seront utilisés pour un maximum de 160 oiseaux sur l'ensemble du projet. Le recours au modèle animal permettra d'obtenir en conditions contrôlées des prélèvements dans lesquels le virus étudié est naturellement associé de la façon la plus représentative possible à la matrice de prélèvement : ces prélèvements sont ceux qui se rapprochent le mieux des prélèvements collectés en élevage lors du diagnostic des infections des volailles sur le terrain, ce qui n'est pas le cas des échantillons artificiellement contaminés par l'agent pathogène. L'effectif qui sera utilisé pour chaque espèce a été établi d'après les recommandations de l'Office international des épizooties : celui-ci permet, outre la constitution d'une échantillothèque d'un volume suffisant, l'exploitation statistique des résultats pour comparaison entre les espèces inoculées et les types de prélèvements réalisés. Cette analyse complémentaire des résultats permettra d'orienter scientifiquement le choix des stratégies de surveillance et de gestion établies par les autorités sanitaires (notamment le choix des prélèvements et des méthodes à privilégier). Les échantillons seront également utilisés dans la mise en oeuvre du contrôle des réactifs et des méthodes de diagnostic officialisées et reconnues pour la surveillance de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle.

Les oiseaux utilisés au cours de la procédure expérimentale seront élevés en groupes séparés par espèce, en volière sur litière au sol, et bénéficieront d'un enrichissement social. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien permettant la détection des points limites préalablement définis : en cas d'atteinte de ces points limites, les oiseaux seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

13694 Chez l'homme, l'hyperactivité détrusorienne est définie par l'International Continence Society comme étant « la constatation urodynamique de contractions détrusorienne involontaires pendant la phase de remplissage vésical, qui peuvent être spontanées ou provoquées ». On distingue deux

types d'hyperactivité détrusorienne selon le facteur étiopathogénique en cause (1) idiopathique (aucune cause définie) ou (2) neurogène (HDN) (cause neurologique identifiée, comme par exemple un traumatisme médullaire). La prise en charge médicale des patients est financièrement très lourde, notamment suite aux complications urologiques, modifications urodynamiques, infections urinaires ou insuffisance rénale chronique. Ces complications sont les premières causes de réhospitalisation et affectent la qualité de vie et la morbidité des patients. Ainsi, ce syndrome est un réel problème de santé publique.

Le bon fonctionnement du bas appareil urinaire impose l'intégrité du système nerveux central et périphérique, somatique et neurovégétatif. C'est à cette seule condition que la motricité vésico-sphinctérienne peut assurer l'alternance des phases de remplissage (continence) et de vidange (miction), par des phénomènes d'activation/désactivation de fibres musculaires. Malgré les avancées médicales et chirurgicales, les traitements actuels pour cette pathologie sont limités. Les antimuscariniques sont le traitement de première intention. Cependant, l'efficacité de cette prise en charge est limitée et les effets secondaires des antimuscariniques peuvent altérer l'observance du traitement. En deuxième intention, l'injection intradétrusorienne de toxine botulique A peut être proposée. Toutefois, son efficacité à long terme n'est pas connue et le caractère invasif de sa délivrance est certain. En 1997, a été proposée une alternative clinique aux patients non répondeurs aux traitements de 1^{ère} et 2^{ème} intention : la neuromodulation sacrée. Cette technique consiste à stimuler la racine sacrée S3 qui assure le contrôle du système urinaire afin de restaurer le contrôle mictionnel des patients souffrant d'hyperactivité vésicale. Cependant, cette thérapie chez les patients HDN reste rare et les résultats cliniques controversés. Il est donc nécessaire de conduire une recherche visant à comprendre, développer et optimiser l'efficacité de cette thérapie innovante par la réalisation de tests précliniques sur un modèle animal fiable.

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation pathophysiologique. Dans ce contexte, le modèle préclinique le plus pertinent qui présente des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine est le rat ayant subi une transection de la moelle épinière (SCI). Ce modèle de rats SCI sera donc employé pour évaluer l'effet d'un dispositif de stimulation électrique pour le traitement de l'HDN. Les études précliniques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation de 960 rates sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (12 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux est réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. De plus, une grille d'évaluation de la douleur sera utilisée de façon systématique lors des expériences ayant des procédures sévères et une décision d'euthanasie des animaux sera prise pour un score supérieur à 6. Enfin, ces animaux présentent un trouble mictionnel qui nécessite un change adapté : augmentation de la fréquence, augmentation de la quantité de litière (raffinement).

13695 Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des hémopathies malignes induites par la prolifération anormale et incontrôlée de cellules lymphoïdes T immatures. Malgré l'amélioration de la prise en charge des LAL, le devenir des patients atteints de LAL-T reste péjoratif avec environ 30% de rechute dans les deux années qui suivent le diagnostic. Ainsi, les défis auxquels nous sommes confrontés dans le domaine des LAL-T sont d'identifier des sous-groupes de patients pouvant bénéficier de thérapies ciblées, si possible moins toxiques que les chimiothérapies utilisées à ce jour, mais également de résoudre les problèmes de rechute précoce et de résistance au traitement.

Le principal objectif de ce projet est de générer une collection de xénogreffes. Pour cela des cellules primaires de LAL-T humaines seront transplantées dans des souris immunodéficientes. Ces souris xénogreffées 1°) permettent d'amplifier le nombre de cellules leucémiques humaines et ainsi rendre possible des expériences de recherche fondamentale ; 2°) représentent des modèles précliniques permettant de tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Pour ces souris, nous respecterons la règle des 3R (replace, reduce, refine) afin d'optimiser leur utilisation et limiter leur souffrance.

Replace. A ce jour les cellules primaires de LAL-T ne sont pas cultivables *in vitro*. Nous avons testé différentes conditions de culture (ajout de cytokines dans le milieu, stimulation, culture sur cellules stromales) mais nous n'avons pas réussi à faire proliférer ces cellules leucémiques primaires. Or, certaines LAL-T humaines (environ 50%) prolifèrent avec succès *in vivo* dans des souris immunodéficientes. Ainsi l'utilisation de ces souris et la réalisation de xénogreffes représente à ce jour la seule approche permettant d'obtenir des cellules viables de LAL-T primaires humaines.

Reduce. Sur 5 ans notre estimation du nombre de souris utilisées est de 350. Notre expérience dans l'obtention de xénogreffes à partir de cellules de Patients, nous a permis de définir un nombre minimum de souris à utiliser pour mener à bien la génération de ces xénogreffes : 7 souris/LAL-T.

Refine. Les souris sont hébergées dans une animalerie de statut EOPS. Si on considère que le but de l'enrichissement est de faire diminuer le stress des animaux, alors on peut compter sur tout ce qui est déjà mis en œuvre dans ce sens dans l'animalerie (température régulée, Hygrométrie contrôlée, Calme des animaleries, Photopériode contrôlée). De plus les procédures et la manipulation des souris sont réalisées par des personnes responsables et formées. Les souris (maximum 5 souris adultes/cage) sont hébergées dans des cages (520 cm²) enrichies (coton/matériel pour confectionner des nids & dôme) et elles sont surveillées quotidiennement. Le change des cages est réalisé de manière hebdomadaire. De plus nous limitons au maximum la manipulation des souris afin de réduire leur stress. Grâce à notre expertise sur nos modèles murins nous avons établi une grille de critères permettant d'évaluer la prise de greffe et la douleur des souris ; cette grille définit également les points limites conduisant à la mise à mort des souris.

13696 Bien que la prévalence de la perte totale des dents a diminué au cours des dix dernières années, l'édentation reste une maladie majeure dans le monde entier, particulièrement chez les personnes âgées.

Le remplacement des dents perdues par des implants est devenu une pratique courante dans les cliniques au cours des dernières décennies. Cependant, les patients édentés ne possèdent pas, dans la plupart des cas, suffisamment de tissu osseux afin de permettre la pose d'implants dentaires de manière efficace. Des procédures régénératrices sont alors souvent envisagées.

La greffe osseuse reste la procédure standard mais présente les désavantages d'une quantité limitée de matériel mais également une morbidité importante au niveau du site donneur. Pour pallier à ces inconvénients, l'association de biomatériaux à base de phosphate de calcium, constituant naturel de nos os, à des membranes résorbables ou non, est fréquemment utilisé. Ces « substituts osseux » sont connus pour être ostéoconducteurs et favoriser la régénération.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'augmentation osseuse verticale suite à l'extraction des prémolaires et molaires et à la création de défauts mandibulaires bilatéraux chez le miniporc, par greffe de biomatériaux imprimés 3D associés ou non à leurs propres cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse, après 5 mois d'implantation. Cette étude permettra d'évaluer l'efficacité de la régénération osseuse en vue d'une application clinique chez des patients édentés nécessitant une augmentation osseuse en vue de la pose d'implants dentaires. Cette régénération osseuse sera étudiée suite au sacrifice des animaux, par des méthodes de microscanner et études histologiques.

Cette expérimentation est réalisée en respectant le principe des 3R: il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour évaluer la régénération osseuse, étape pré clinique indispensable avant des essais chez l'homme ; de plus, le nombre d'animaux est réduit au maximum en tenant compte de la variabilité inter individus. Le raffinement est assuré par l'attention particulière apportée aux soins péri-opératoires avec notamment la gestion de la douleur pré et post-opératoire, le suivi des paramètres physiologiques durant la chirurgie ainsi que la définition de points limites. L'administration analgésique sera répétée pendant 3 à 5 jours en post-chirurgie et adaptée en fonction de l'évaluation de la douleur chez l'animal.

12 animaux seront utilisés dans cette étude, dont 2 pour une étude préliminaire pilote. Ils seront hébergés en enclos individuels dans des box capitonnés. Des jouets spécifiques leur seront mis à disposition et ils seront observés et examinés quotidiennement, rationnés et auront accès librement à l'eau de boisson (ad libitum).

13697 L'obésité, qui concerne aujourd'hui près de 13% de la population, se caractérise d'une part par une accumulation excessive de lipides dans l'organisme et d'autre part par une inflammation chronique dite de « bas bruit ». Les données de la littérature montrent que l'obésité est associée à une perturbation de la préférence alimentaire pour les lipides, de l'absorption des lipides ingérés, ainsi que de l'entrée de facteurs pro-inflammatoires provenant du microbiote intestinal souvent associée à l'absorption intestinale des lipides. L'ensemble de ces paramètres dépend du bon fonctionnement de la détection orale et intestinale des lipides alimentaires.

La protéine transmembranaire CD36, exprimée de façon ubiquitaire dans tout l'organisme, a été identifiée comme responsable de la détection des lipides au niveau oral et intestinal. Pour cette raison CD36 pourrait participer à la mise en place de l'obésité liée à un excès de consommation de lipides.

Toutefois, l'intestin est composé de différents types de cellules exprimant du CD36 (cellules endocrines, immunitaires et absorbantes), l'objectif est d'évaluer la contribution du CD36 des entérocytes, cellules intestinales responsables de l'absorption des lipides, qui représentent 90 % des cellules de l'épithélium. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle original de souris transgéniques, déficientes en CD36 spécifiquement au niveau entérocytaire. Pour évaluer la contribution de CD36 dans la mise en place de l'obésité liée à la surconsommation de lipides, ces souris seront soit nourries avec un régime riche en lipides et soit un régime normo-lipidique.

Pour comprendre le rôle du CD36 entérocytaire, nous mesurerons l'évolution de la masse grasse, de la dépense énergétique, de la préférence pour le gras, des capacités d'absorption intestinale des lipides, de l'inflammation et du microbiote intestinal pendant ces différents régimes.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R : Le remplacement est impossible car il s'agit d'étudier des processus physiologiques mettant en jeu plusieurs organes (langue, intestin et tissu adipeux). Il est donc indispensable de recourir au modèle animal pour une approche intégrée. Le nombre total d'animaux a été réduit à 176, minimum requis pour assurer la fiabilité des analyses statistiques. En ce qui concerne le raffinement, les animaux seront hébergés dans des conditions optimales avec un enrichissement de leur milieu adapté. Ils bénéficieront d'un suivi quotidien de leur état général. Lors des procédures expérimentales, les actes susceptibles d'entraîner une souffrance ou une douleur seront réalisés sous anesthésie générale, par des personnes expérimentées, en surveillant le maintien de la température corporelle grâce à une table chauffante spécifique. S'agissant d'un projet nécessitant l'utilisation d'animaux vivants, l'utilisation de techniques non invasives et indolores ainsi que de tests comportementaux est privilégiée afin d'acquérir les paramètres physiologiques nécessaires au projet tout en respectant les questions d'éthiques en expérimentation animale et la règle des 3R. De plus, des points limites en adéquation avec ce projet ont été définis (signes généraux de souffrance, perte de poids supérieure à 20% en quelques jours, prise de poids pouvant gêner la locomotion). En cas d'atteinte d'un de ces points limites, l'animal concerné sera retiré du projet. Enfin, un nombre restreint d'expérimentateurs disposant d'une formation et d'une qualification adéquate à l'expérimentation animale interviendra dans ce projet.

13698 Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont des affections malignes des cellules de la moelle osseuse, lieu de production des cellules sanguines. Ces leucémies se développent préférentiellement chez des sujets âgés. Environ 2800 nouveaux cas annuels sont diagnostiqués en France et le pronostic reste défavorable. Si les traitements actuels de multi-chimiothérapie permettent d'obtenir des taux élevés de réponse favorable lors du traitement initial, des rechutes, qui entraînent le plus souvent un décès dans les cinq ans chez deux tiers des patients sont encore observées. Les travaux de génétique ont depuis longtemps montré que tout ne dépend pas du patrimoine génétique mais aussi des mécanismes non héréditaires, induits par l'environnement et

l'histoire individuelle. Par exemple, des perturbations chimiques environnementales, des instructions envoyées par le cerveau ou par le système hormonal, vont influencer dans une proportion non négligeable l'expression des gènes sans que ceux-ci ne soient altérés. Ces mécanismes de régulation sont dits épigénétiques. Un certain nombre de protéines induisant ces modifications épigénétiques sont responsables de cancers solides et de leucémies. C'est le cas de notre protéine d'étude PRMT2.

Les cancers en général et les leucémies en particulier sont des maladies résultant de plusieurs facteurs dont le développement ou la régression sont largement influencés par les interactions physiques et chimiques avec les cellules de l'organisme. Ainsi, afin de mieux comprendre ces leucémies et pour développer de nouveaux traitements, nous utiliserons des souris transgéniques ou irradiées permettant ainsi de développer des leucémies. Elles seront alors soumises à de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Tous les animaux sont mis à mort à la fin de cette période d'exposition afin d'analyser leurs paramètres sanguins et différents tissus d'intérêt. Nous travaillons en parallèle sur des cellules de patients (remplacement).

Pour la réalisation de ce projet, 310 animaux au maximum seront utilisés. La réduction est prise en considération à travers le choix des protocoles visant à limiter le nombre d'animal tout en conservant la fiabilité requise afin de satisfaire aux critères scientifiques. L'amélioration du bien-être animal résulte ici tout d'abord de la qualité reconnue de l'animalerie dans laquelle les animaux évoluent, c'est-à-dire dans un environnement peu bruyant et peu stressant, propice à leur bon développement et à la qualité des expérimentations. Outre les conditions d'élevage et d'hébergement, les études sont raccourcies au maximum et les procédures d'euthanasie sont appropriées. Pour que les injections et les prélèvements nécessaires soient le moins douloureux possibles pour les animaux, les expérimentateurs sont formés à ces manipulations. Ainsi, leurs gestes sont précis, la manipulation est rapide et les animaux cicatrisent rapidement. De plus, la zone d'injection ou de prélèvement est désensibilisée par application d'une crème contenant de la lidocaïne (anesthésique locale à action rapide et courte). De plus, pour éviter tout risque d'infection, un antibiotique (la Ciprofloxacine) est dilué dans l'eau de boisson pendant 2 semaines (raffinement).

13699 Avant de réaliser des essais chez l'homme, il est indispensable d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament par l'intermédiaire d'études précliniques. Les études précliniques font en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est primordiale pour avoir une meilleure connaissance d'un futur médicament avant d'envisager son administration chez l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de caractériser sur son efficacité, sa toxicologie et son comportement pharmacocinétique. Toutes ces études permettront ensuite de constituer une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament. Il est donc indispensable de réaliser ces études pour envisager d'offrir un nouveau panel de médicament aux patients.

Ces dernières années le développement de nouvelles approches d'immunothérapie des cancers a apporté un progrès considérable dans la prise en charge thérapeutique de certaines pathologies tumorales, telles que certains cancers de la peau (mélanome) et du poumon (NSCLC) par exemple. L'une des avancées majeures a été le développement d'anticorps monoclonaux (mAb) thérapeutiques ciblant le récepteurs PD-1 ou son ligand PD-L1 exprimé à la surface des cellules tumorales. Ces nouveaux médicaments biologiques – 5 mAbs anti-PD(L)1 sont actuellement commercialisés – ont permis d'améliorer considérablement la prise en charge de certaines tumeurs solides, attestant ainsi de la pertinence de la cible thérapeutique et du bienfondé de l'approche médicamenteuse. Cependant, les taux de réponses sont souvent limités (30 à 50% au mieux), les rechutes fréquentes et l'utilisation de ces produits injectables est contraignante, limitant notamment les possibilités de combinaisons thérapeutiques ou l'accès à certains organes (tumeurs cérébrales). Des effets secondaires néfastes, notamment ceux affectant le système endocrinien (thyroïde), sont souvent observés. Par ailleurs, ces médicaments biologiques sont excessivement chers pour les agences de santé. Les coûts de production des mAbs sont bien plus élevés que ceux des petites molécules, en règle générale. Pour pallier à ces limitations, des petites molécules ciblant le même

effecteur immunologique PD1/PDL1 sont actuellement développées. Le projet présenté s'inscrit dans cette démarche et vise à développer une nouvelle famille de composés récemment identifiés (et brevetés) ciblant très sélectivement le ligand tumoral PD-L1.

Le but de ce projet étant d'étudier l'effet de nouveaux traitements potentiels sur la réponse anti-tumorale dans des modèles animaux mimant différentes formes de cancer chez la souris.

Pour ce projet nous pensons effectuer 4 modèles tumoraux ce qui représente l'utilisation de 450 animaux sur 5 ans. En conclusion, ce projet permet d'envisager des bénéfices cliniques et économiques évidents.

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

- « Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites de souffrance.

13700 Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements anticancéreux, notre partenaire a mis au point deux composés. Ceux-ci ne sont pas spécifiques d'un type de cancer et pourraient s'avérer très utiles pour compléter l'arsenal thérapeutique à disposition des médecins.

Néanmoins, leur développement est encore à un stade précoce. Ils ont montré une preuve d'efficacité dans des modèles *in vitro* et doivent désormais être testés sur un modèle animal avant de pouvoir atteindre la phase d'essai clinique.

La première étape est de tester l'absence d'effets indésirables sur des animaux sains.

Pour cela, nous prévoyons donc un protocole similaire à celui qui serait employé sur un animal porteur de tumeur, à savoir 3 injections par semaine durant 5 semaines.

Les deux composés seront testés aux doses efficaces définies à l'aide des tests *in vitro*, et comparés à un traitement de référence utilisant un mode d'action assez proche.

Nous prévoyons donc 40 souris dans ce projet, qui seront réparties en quatre groupes expérimentaux de 10 animaux : groupe contrôle, groupe traité avec le composé 1, groupe traité avec le composé 2, groupe traité avec le composé de référence utilisé en clinique humaine.

Ils seront surveillés quotidiennement pour s'assurer qu'aucun effet délétère des produits n'est observé.

A la fin des cinq semaines de traitement, un prélèvement de sang sera réalisé ainsi qu'une analyse histologique.

REDUCTION : l'effectif de 10 souris constitue une taille de groupe optimale pour une recherche d'effets indésirables, il permettra de définir de manière fiable les effets potentiels constatés ainsi que leurs fréquences d'occurrence. Nous ne pouvons pas réduire cet effectif dans cette première étude pilote. Dans les projets ultérieurs, nous utiliserons les données générées ici pour définir la taille de groupe optimale.

REMPLACEMENT : Dans le cadre de la recherche de potentiels traitements anti-cancéreux, le recours à un modèle animal est encore obligatoire. Nous ne disposons pas de méthode alternative pour déterminer les effets indésirables ou les potentiels thérapeutiques de composés. Ce projet constitue la première étape d'un projet de développement préclinique, la suivante utilisera des modèles animaux porteurs de tumeurs que nous chercherons à traiter ; dès lors, nous devons nous placer dans des conditions similaires.

RAFFINEMENT : les composés qui sont testés ici ont déjà montré leur innocuité sur des cultures cellulaires et nous n'attendons pas d'effets indésirables majeurs. Néanmoins, les souris seront surveillées tous les jours. Elles disposeront de conditions d'hébergement optimales, avec accès à l'eau, à la boisson et à un enrichissement du milieu. Elles seront maintenues en groupe afin de conserver les interactions sociales, importantes pour cette espèce. Les sites d'injection seront surveillés afin d'éviter toute infection, qui, si cela se produisait, serait traitée avec les conseils de notre vétérinaire.

13701 L'étude des cétacés en milieu naturel peut être limitée par l'accès à des échantillons biologiques, cruciaux pour une compréhension de leur écologie, de leur biologie et de l'impact des activités humaines sur leurs populations. Durant les dernières décennies, la collecte de biopsies cutanées de peau et de lard a contribué à fortement augmenter le volume d'information sur les populations sauvages de cétacés dans le monde, tout particulièrement dans les régions où l'accès à des carcasses (et donc à des contenus stomacaux) sont rares. Malgré leur volume limité, ces biopsies constituent une source importante d'information, en particulier pour comprendre l'écologie alimentaire, l'identité génétique ou encore les concentrations en polluants présents dans leurs tissus. Les échantillons sont collectés à l'aide d'une arbalète, de flèches flottantes et d'un embout à emporte-pièce. Les flèches sont tirées à partir d'une embarcation qui suit l'animal dans son environnement, alors qu'il nage librement : il n'y a aucune capture, et le contact avec l'animal dure moins d'une seconde. Les embouts sont de taille variable en fonction de l'espèce échantillonnée : 5 mm de diamètre et 40 mm de longueur pour les grands cétacés (baleines), 5 mm de diamètre et 25 mm de longueur pour les petits cétacés (dauphins). L'arbalète utilisée (Panzer V ou modèle similaire) a une tension 68 kg. De nombreuses publications démontrent le faible impact de cette méthode sur le comportement et l'état de santé des cétacés. La cicatrisation est complète après quelques semaines. Dans le cadre de ce projet, il est proposé de réaliser 30 biopsies par espèce et par année sur des individus adultes de plusieurs espèces de cétacés fréquentant les eaux françaises. Au maximum, cela concernera 1500 individus sur l'ensemble de la période (10 espèces * 30 individus par an * 5 ans). Les femelles adultes accompagnées d'un jeune (d'une taille inférieure à la moitié de la longueur de la mère) ne seront pas échantillonnées afin de ne pas perturber la relation mère-petit. La "règle des 3R" a été prise en compte de la façon suivante : le Remplacement des animaux n'est pas possible puisque l'objectif même du projet est de mieux connaître et décrire l'écologie d'espèces sauvages à préserver, il est donc indispensable d'échantillonner des individus de ces espèces dans leur milieu naturel. La Réduction est réalisée par le choix de prélèvement d'échantillons uniques sur un maximum de 30 individus par espèce et par an : ces effectifs permettent de prendre en compte la variabilité interindividuelle, parfois forte chez ces prédateurs supérieurs, sans affecter une trop large proportion des individus dans le groupe social. Enfin, le Raffinement des procédures est réalisé par une diminution des sources de stress chez l'animal : la biopsie est un acte très rapide ce qui ne peut donc occasionner qu'un stress très limité dans le temps et l'approche en bateau est effectuée de façon la plus progressive possible afin de ne pas perturber l'activité naturelle des animaux. La douleur occasionnée par la biopsie est supposée limitée car elle ne concerne que des tissus superficiels qui sont relativement peu innervés.

13702 Au sein du laboratoire nous travaillons sur 2 thématiques principales.

La 1^{ère} thématique porte sur l'étude du répertoire TCR (T Cell Receptor) des lymphocytes T chez la souris. Le TCR est le récepteur situé à la surface des lymphocytes T qui permet de reconnaître l'antigène (présent à la surface d'une bactérie, d'une cellule infectée ou tumorale, etc...) présenté par les cellules présentatrices d'antigène via leur CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Le complexe TCR-antigène-CMH une fois formé va permettre l'activation d'une réponse immunitaire en réponse à la présence de cet antigène. L'étude de ce répertoire TCR chez un individu, c'est-à-dire l'ensemble de tous les TCR d'un individu, s'effectue après le tri des cellules d'intérêt par cytométrie en flux, puis du séquençage des séquences spécifiques de l'ADN codant pour le TCR. Ainsi, en comparant les répertoires TCR de souches murines saines à celui de souches déclenchant spontanément des maladies auto-immunes (MAI) comme le diabète de type 1 (DT1), nous pourrions

être en mesure de découvrir des antigènes spécifiques déclenchant la maladie. La caractérisation de ces TCR spécifiques d'antigènes particuliers pourront être considérés comme des biomarqueurs spécifiques des MAI, mais aussi de développer des immunothérapies spécifiques applicables chez l'homme.

La seconde étude porte sur la modulation des lymphocytes T régulateurs (LTregs) via différentes stratégies thérapeutiques (vaccination, cytokines, etc..). Les LTregs sont des cellules du système immunitaire qui permettent d'atténuer l'efficacité des Lymphocytes T conventionnels. Leur rôle est donc essentiel pour qu'un individu ne développe pas de maladie auto-immune (MAI) après l'attaque de ses propres cellules par son système immunitaire. En effet, dans les MAI comme le diabète de type 1 (DT1), ces LTregs sont généralement déficitaires de manière quantitative et/ou qualitative. Il est donc essentiel de valider nos immunothérapies visant à moduler les LTregs dans des modèles spontanés de MAI comme le DT1.

Dans ces 2 études réalisées au sein de l'animalerie où se déroulent les expériences *in vivo* (animalerie d'expérimentation), nous avons besoin d'animaux développant spontanément une MAI. Les souris NOD (Non Obese Diabetic mice) sont des animaux qui développent spontanément un DT1 similaire à celui des humains. Ce modèle est connu et utilisé depuis longtemps par notre laboratoire ; c'est un modèle parfaitement connu et adapté à nos études sur le répertoire TCR et à celle des LTregs dans les MAI. De plus nos animaux NOD expriment la GFP (Green Fluorescent Protein) dans les LTregs ce qui va faciliter leur isolement et leur caractérisation en vue de leur séquençage ou de leur phénotypage.

Cette demande de projet concerne donc l'élevage de la lignée murine NOD Foxp3 GFP, à phénotype dommageable, au sein de l'animalerie où sont élevées nos animaux transgéniques (animalerie d'élevage). Les animaux générés seront ensuite transférés à l'animalerie d'expérimentation où seront réalisés les différents protocoles liés aux 2 études citées précédemment.

L'aspect spontané, non induit, et donc physiologique du développement du diabète chez ces animaux, ainsi que le caractère transgénique par l'expression ciblée de la GFP font que ces animaux ne peuvent pas être remplacés ni par un modèle *in vitro* ni par un autre modèle animal. Pour réaliser ces projets, 1558 souris sont nécessaires sur les 5 ans. La majorité des animaux utilisés devront être des femelles. En effet l'incidence naturelle de la maladie chez les femelles peut atteindre 80% à 1an de vie alors qu'elle n'est en moyenne que de 20% chez les mâles. Il est donc plus intéressant d'observer le répertoire TCR ou l'effet de nos immunothérapies chez les femelles NOD. Les mâles seront utilisés dans certaines expériences comme contrôles. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214–105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Par exemple, seules les stratégies validées *in vitro* seront testées chez l'animal. Des études exploratoires sur un petit nombre de souris seront réalisées pour sélectionner les meilleures stratégies avant d'évaluer leur efficacité thérapeutique sur un nombre plus important d'animaux. Finalement, l'obligation de raffinement sera également prise en compte dans l'élevage des animaux. Le diabète peut se développer spontanément à partir de 10 semaines d'âge. Les animaux seront surveillés étroitement par les zootechniciens en charge de l'élevage et les signes de diabète seront diagnostiqués: polyuries, poil hirsute, dos voûté et glycosurie au besoin. Dès qu'un animal sera diagnostiqué comme malade il sera alors euthanasié dans les 48h.

13703 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie du poumon létale sans traitement capable de renverser ou stopper sa progression. La FPI est caractérisée par l'activation de populations cellulaires distinctes de cellules qui communiquent entre elles de façon aberrante. Cette communication anormale entre les cellules favorise un phénomène de remodelage du tissu pulmonaire rendant impossible les échanges gazeux nécessaires à la vie. Nous proposons d'étudier un système de communication intercellulaire appelé vésicules extracellulaires (VE). Les VE, incluant les exosomes, sont secrétées par les cellules et peuvent acheminer différents messages

en fonction des composants qu'elles transportent. Les VE s'accumulent au niveau pulmonaire chez les patients atteints de FPI et dans les modèles animaux de fibrose pulmonaire. Cependant, le mécanisme d'action des VE dans la FPI reste incompris. Notre équipe s'intéresse au rôle des protéines de choc thermique (HSP) dans la fibrose pulmonaire. Plusieurs HSP sont surexprimées dans la FPI (certaines retrouvées au niveau extracellulaire) où elles activent des processus clé de la fibrose. Nous avons observé que certaines HSP sont transportées dans des VE lors de la fibrose pulmonaire.

Notre hypothèse est que des HSP liées aux VE (VE-HSP) favorisent la progression de la fibrose et que leur inhibition pourrait représenter une approche thérapeutique de la FPI. Ce projet s'articule autour de 3 objectifs : 1) établir un profil des VE-HSP durant la fibrose pulmonaire, 2) étudier le mode d'action des VE-HSP au niveau pulmonaire et 3) évaluer les effets de l'inhibition des VE-HSP sur les mécanismes de la fibrose.

Notre modèle sera basé sur l'injection d'un agent anti-cancéreux, la bléomycine chez la souris C57Bl/6. Ce modèle est le plus utilisé et reconnu dans la communauté scientifique. Nous suivrons l'évolution des VE et VE-HSP durant le modèle, de sa phase aigüe jusqu'aux temps tardifs (56 jours post-bléomycine). Nous utiliserons plusieurs approches d'inhibition des HSP pour produire des VE avec délétions spécifiques de certaines HSP. Enfin, nous étudierons les effets de ces différentes VE sur des modèles *ex vivo* : culture de cellules pulmonaires primaires et culture 3D de tissu pulmonaire (LTC).

Ce projet nécessitera 828 souris (C57Bl/6, SV129 et SV129-Hspb5-/-) sur les 3 ans du projet. Nous utiliserons une stratégie suivant la règle des 3R. Nous remplacerons si possible l'expérimentation sur animaux par des expériences sur des modèles (cultures primaires, LTC) *in vitro*. Cependant, la complexité du poumon et du phénomène de fibrose qui fait intervenir plusieurs processus (inflammation, remodelage tissulaire) rend indispensable l'étude sur animal entier. Nous réduirons le nombre d'animaux au minimum requis pour remplir les conditions des tests statistiques. Nous raffinerons nos expérimentations pour produire des données les plus pertinentes possibles tout en réduisant l'inconfort des animaux et nous réduirons le nombre d'animaux au minimum tout en permettant de remplir nos objectifs. Une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux (densité par cage, enrichissement de milieu). Les souris auront accès à une alimentation enrichie pour limiter la perte de poids et la déshydratation qui caractérisent le modèle. Nous utiliserons des points limites précoces permettant d'éviter une souffrance susceptible d'avoir une incidence grave sur l'état général des animaux. Le modèle de fibrose pulmonaire sera appliqué par du personnel qualifié et entraîné.

Les souris auront accès à une alimentation enrichie pour limiter la perte de poids et la déshydratation qui caractérisent le modèle. Nous utiliserons des composés de grade clinique (bléomycine, inhibiteurs de HSP) et un modèle de souris génétiquement modifiées qui n'a pas d'impact sur la qualité de vie des animaux.

13704 La colibacillose est une cause majeure de mortalité et d'utilisation d'antibiotiques en production de volailles et c'est la maladie la plus fréquente chez les poulets de chair. Or, il n'existe pas actuellement de méthodes de prévention efficace (vaccins peu efficaces). Le projet, dans sa globalité, vise à développer des outils de détection et de caractérisation précoces et rapides des souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) qui seront regroupées en clusters (groupes d'*E. coli* semblables). Ces clusters serviront à développer des modèles de reproduction de la pathologie chez le poulet, cette partie faisant l'objet de la présente saisine. Au final, les modèles développés seront utilisés pour évaluer l'efficacité, chez des poussins, de vaccins administrés aux poules reproductrices, cette partie faisant l'objet d'une saisine ultérieure.

Deux souches de poulets seront utilisées car le développement de la pathologie peut être différent selon les souches : souche Leghorn EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiés) de notre laboratoire et une souche de poulet du terrain (Ross 308). L'objectif est de voir si les clusters d'*E. coli* se comportent de la même manière sur les deux souches de poulets. Cette saisine utilisera au total 380 poussins servant à développer les modèles pour 3 clusters d'*E. coli*. Les animaux seront hébergés au sol, sur litière et bénéficieront d'enrichissements appropriés. Les modèles développés

sont susceptibles de rendre les animaux malades mais toutes les précautions seront prises pour abrégéer une éventuelle souffrance. L'utilisation des animaux est indispensable pour ce projet. Cependant, le nombre d'animaux a été fixé au minimum acceptable pour atteindre les objectifs du projet.

13705 Les patients atteints de maladie d'Alzheimer (MA) présentent une perte importante de synapses dans le cortex cérébral, dont le mécanisme reste mal connu. L'analyse des modifications synaptiques précédant cette perte pourrait renseigner sur le processus pathologique. Des mutations dans les gènes codant pour la protéine précurseur de l'Amyloïde (APP) entraînent des formes familiales de MA à début précoce. Chez les souris transgéniques sur-exprimant l'APP muté, la perte de synapses est précédée par un changement de forme des synapses. Nous avons aussi observé cette modification de forme des synapses dans des biopsies de patients atteints de MA. Des modélisations mathématiques nous ont permis de montrer que la diminution de résistance électrique qui s'ensuit devrait altérer l'activation des synapses, et en particulier l'activation des récepteurs NMDA (RNMDA) qui sont importants pour la plasticité synaptique (potentialisation à long terme des synapses) et la mémorisation. Cela pourrait expliquer les déficits précoces de mémorisation observés dans ces modèles murins comme chez les patients atteints de MA. Notre objectif est d'utiliser une approche pharmacologique pour rétablir le niveau d'activation des synapses en dépit de leur altération morphologique.

Nous utiliserons la règle des 3R : 1) réduction, le nombre d'animaux est réduit au maximum pour obtenir des données reproductibles, en nous basant sur notre connaissance du modèle murin et des quantifications à faire nous utiliserons 400 souris ; 2) raffinement, les méthodes sont choisies pour réduire ou supprimer la douleur et le stress, en particulier un suivi est effectué en post-opératoire pour dépister tout signe de douleur ou d'anxiété, et des antalgiques sont administrés de manière préventive ; 3) remplacement, les études que nous menons, sur une pathologie liée au vieillissement et ses effets sur les synapses matures, ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques mimant les lésions de la MA.

13706 Le projet a pour objectif de développer, tester et valider de nouvelles immunothérapies pour le traitement des maladies auto-immunes. Dans ces situations où l'activation du système immunitaire est trop importante et conduit à des atteintes contre les propres constituants de l'organisme, il est indispensable de proposer des stratégies thérapeutiques pour réguler et contrôler la réactivité du système immunitaire. Pour cela, notre approche est de cibler directement les lymphocytes T suppresseurs, dits T régulateurs (Treg), et/ou favoriser leur émergence en apportant les signaux immunomodulateurs requis. A la différence des traitements immunosuppresseurs classiques qui compromettent la fonctionnalité du système immunitaire, y compris contre les agents infectieux, nous cherchons à induire une tolérance spécifique.

Deux axes seront développés visant (i) à stimuler les Treg au moyen de faibles doses d'interleukine-2 (IL-2) en association éventuellement avec l'antigène ciblé pour renforcer la spécificité de la thérapie, (ii) à induire un état de non-réponse spécifique après une vaccination tolérogène. Fort de notre expérience en vaccination, nous proposons une nouvelle plateforme vaccinale de type pseudo-particules virales (ou VLP pour 'Virus-like particle') permettant d'induire un contrôle de la réactivité lymphocytaire et visant à recruter les Treg pour induire une tolérance durable. Le projet inclut de définir les conditions d'administrations optimales pour cette induction de tolérance et ensuite d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ces stratégies dans des modèles de maladies auto-immunes chez la souris.

Pour réaliser ce projet, 2200 souris sont nécessaires sur les 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal et tenant compte de l'effectif minimal pour atteindre une puissance statistique suffisante (Calculée avec G*Power). Par exemple, seuls les stratégies validées *in vitro* seront testées chez l'animal. Des études exploratoires sur un petit

nombre de souris seront réalisées pour sélectionner les meilleures stratégies avant d'évaluer leur efficacité thérapeutique sur un nombre plus important d'animaux. De plus, la combinaison des stratégies thérapeutiques sera réalisée uniquement si celles-ci montrent des effets indépendamment. De plus, nous remplacerons (règle des 3R) toujours les expériences chez l'animal par des tests *in vitro*, si cela est possible. Par exemple, l'étude des mécanismes induits par nos candidats vaccins pourront en grande partie être abordés par des tests *in vitro*, notamment pour évaluer l'impact sur les cellules dendritiques. Par ailleurs, nous veillerons systématiquement à diminuer les contraintes et la douleur qui peuvent être liées à la mise en œuvre expérimentale, notamment par une période d'habituation systématique avant expérimentation, un hébergement amélioré, des points d'arrêt anticipés et le recours à des anesthésie et analgésie pour limiter la douleur.

13707 L'athérosclérose est l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. Cette maladie est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Elle se caractérise par une accumulation de cholestérol dans la paroi des vaisseaux qui bouche les artères, gêne le fonctionnement du cœur et conduit à la "crise cardiaque" ou aux accidents vasculaires cérébraux (AVC). Nous avons démontré qu'une molécule appelée "Wnt5a" limite l'accumulation du cholestérol.

L'objet de ce projet est l'identification des mécanismes par lesquels Wnt5a contrôle le devenir du cholestérol dans la cellule musculaire de la paroi des vaisseaux, empêche le cholestérol de s'accumuler dans cette paroi et protège contre les maladies cardiovasculaires.

Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées dont les cellules musculaires des vaisseaux sanguins sont dépourvues de Wnt5a (Sm22Wnt5a). Nous suivrons, par échographie, le développement des embryons jusqu'à leur naissance et nous étudierons les fonctions cardiaques chez les embryons, les nouveaux-nés et les souris adultes. Nous utiliserons pour la validation échographique 42 animaux au maximum sur 5 ans.

Remplacement:

Le modèle animal est, pour le moment, le seul modèle qui permet d'étudier dans son ensemble les phénomènes complexes mis en œuvre dans l'athérosclérose. En effet cette atteinte est multifactorielle et nécessite un grand nombre d'acteurs comme les cellules de l'immunité, les particules de cholestérol circulantes (les LDL ou mauvais cholestérol), les globules rouges. Toutes ces conditions ne sont, malheureusement, pas reproductibles fidèlement dans un modèle de culture cellulaire.

Réduction: Si nous arrivons à mettre en évidence un mécanisme d'action de Wnt5a rapidement, nous n'utiliserons pas le nombre total d'animaux demandé (42 animaux sur 5 ans). Pour cela, dans un premier temps, nous commencerons à utiliser une cohorte formée de 26 souris: 3 souris gestantes femelles qui seront visualisées au milieu de la gestation, 14 fœtus issus de 3 souris gestantes qui seront visualisées juste avant la naissance et 6 souriceaux qui seront visualisés à 2 jours post natal. Dans un second temps, les souris dépourvues de Wnt5a qui survivent environ une semaine après la naissance seront également analysées. Les paramètres cardiaques ainsi que la morphologie du cœur et des vaisseaux seront suivis après 2, 4, 6 et 9 mois après la naissance (16 souris au total). Il a déjà été montré que ces souris ne présentent pas de signe dommageable dû à l'excision de Wnt5a. Les individus nés et sevrés sont viables et ne présentent pas de signe de stress ou de gêne physique durant leur vie (11 mois jusqu'à présent). Une étude rétrospective serait cependant nécessaire pour confirmer ces constatations sur un plus grand nombre d'animaux.

Raffiner: Toutes les procédures sur les animaux adultes et les souriceaux sont réalisées sous anesthésie générale. Le suivi des animaux sera quotidien, les femelles seront mises avec des enrichissements sous forme de morceaux de bois et un carré de coton. Nous contrôlons aussi les points limites prédéfinis par notre vétérinaire à savoir des œdèmes, des prostrations, des hérissements de poils de nos animaux. Des traitements seront apportés à la souris en cas de blessures superficiels.

13708 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

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

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

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

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

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

13709 La coordination motrice est une fonction essentielle de notre cerveau et joue un rôle fondamental dans toutes les activités humaines, des plus banales telles que la marche aux plus complexes comme le langage articulé, ou encore jouer du piano ou conduire une voiture. Le cervelet est une

structure nerveuse essentielle pour l'apprentissage moteur et la coordination motrice, et, depuis les travaux pionniers de Marr, Albus et Ito, un modèle bien établi pour l'étude des mécanismes neuronaux de l'apprentissage. Plus récemment, le cervelet a également été impliqué dans des fonctions cognitives supérieures et son dysfonctionnement pourrait jouer un rôle notamment dans la pathogenèse de l'autisme. Pour pouvoir générer les messages nerveux utiles à la correction des mouvements (ou des processus cognitifs) en cours, les neurones du cervelet analysent en plusieurs étapes une très grande quantité d'informations notamment sensorielles issues de divers sens tels que l'ouïe, le toucher ou la vue. Les détails de ces analyses et leurs bases cellulaires sont encore peu connues, pourtant il est nécessaire de les élucider pour pouvoir espérer développer des interventions médicales précises en cas de dysfonctionnements du circuit.

De nouveaux mécanismes ont récemment été caractérisés dans la toute première étape du circuit, au niveau des contacts (appelés synapses) entre les neurones qui amènent l'information sensorielle au cervelet et les cellules en grain (les neurones les plus nombreux du cerveau) qui sont les premiers à combiner les informations provenant de plusieurs sens. Nous avons incorporé ces mécanismes dans un modèle théorique du cervelet simulé numériquement, afin de prédire comment les propriétés de ces synapses impactent l'activité des neurones dans les étapes successives du traitement en réponse à de réels stimuli sensoriels. Cette simulation par ordinateur constitue un Remplacement des expériences préliminaires qu'il aurait fallu réaliser sur l'animal. Nous allons maintenant valider et affiner ce modèle par des expériences *in vivo* dans le circuit intact, chez la souris anesthésiée et éveillée.

Pour pouvoir étudier précisément l'activité des différents types de neurones dans le cervelet, il est nécessaire d'utiliser les techniques de l'électrophysiologie et de l'imagerie calcique. L'électrophysiologie permet d'enregistrer les très faibles et brèves impulsions électriques (appelées potentiels d'action) qui constituent les messages nerveux. L'imagerie calcique permet de visualiser grâce à un microscope les entrées de calcium dans les cellules, qui ont lieu pendant les potentiels d'action, et ainsi d'enregistrer l'activité de nombreuses cellules voisines simultanément. Cette visualisation est possible grâce à l'expression dans les cellules, avec des techniques virales similaires aux techniques de thérapie génique, de marqueurs fluorescents qui réagissent à la présence de calcium.

Toutes ces techniques sont très bien établies chez la souris. La souris est ainsi un organisme modèle approprié pour ce projet. Son cervelet présente une organisation similaire à celle des autres Mammifères (dont l'Homme). Les souris peuvent également être entraînées à rester sans stress tête fixée dans l'appareil d'enregistrement tout en étant éveillées, ce qui permet d'étudier les circuits neuronaux au cours du traitement d'informations sensorielles dans leur état normal. Enfin, l'utilisation de souris relève d'une logique de Remplacement d'autres modèles animaux comme les Primates.

Le recours à l'animal est nécessaire à ce stade car nous ne disposons pas de suffisamment d'informations sur le circuit pour le reconstituer entièrement dans un modèle informatique. Il est nécessaire d'utiliser l'animal entier plutôt que des tranches de cerveau ou des cultures cellulaires, car le circuit doit être préservé dans son intégralité, et les stimuli sensoriels doivent être pré-traités par les appareils sensoriels adéquats (par exemple le système auditif) avant de parvenir au cervelet. 2600 animaux sont nécessaires sur 5 ans pour 2 procédures et 10 expériences (1800 pour la procédure 1 modérée ; 800 pour la procédure 2 sévère). Cette estimation repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. La biostatistique nous a permis de vérifier que nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé, dans un souci de Réduction de ce nombre.

Ce projet peut occasionner des effets dommageables pour les animaux que nous essayerons de minimiser à toutes les étapes. Nous utiliserons des analgésiques pour prévenir la douleur, et des techniques de chirurgie aseptiques permettant de réduire le risque d'infection à un minimum. Le Raffinement de nos techniques consiste également à enrichir l'environnement des souris et à administrer des récompenses pour éviter que les souris ne soient stressées lors de l'habituation à

la fixation dans le poste d'enregistrement, (utilisation d'une roue d'exercice). Le niveau de sévérité attendu de ce projet est modéré. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude.

13710 Des ateliers technologiques sont réalisés dans le cadre de l'unité d'enseignement « Biotechnologies et Méthodologies Appliquées à la Physiologie » de la première année du Master « Biologie et Santé ». L'objectif est de permettre aux étudiants de comprendre et de maîtriser un certain nombre de techniques expérimentales (génomiques, protéomiques, électrophysiologiques, explorations comportementales, métaboliques et fonctionnelles) en vue de la poursuite de leur master recherche puis de leur doctorat. L'atelier spécifique que nous proposons est centré sur l'étude du comportement animal à travers l'évaluation des capacités de 1) mémoire/apprentissage, 2) du comportement de type émotionnel, ainsi que 3) de la motricité fine. Ce TP s'inscrit pleinement dans cette UE puisqu'il permettra aux étudiants de se former à l'analyse comportementale à l'aide de différents tests proposés. En outre, l'étudiant sera sensibilisé aux bonnes pratiques de laboratoire et à la législation qui régit l'expérimentation animale.

Le comportement animal est l'expression finale de l'intégration de différents signaux sensoriels et électrophysiologiques. Pour comprendre le fonctionnement du système nerveux, il est important de comprendre l'activité comportementale de l'animal.

Les étudiants seront amenés à observer l'animal tout au long de la procédure expérimentale, à acquérir les données en temps réel et appliquer un raisonnement scientifique afin de valider les hypothèses expérimentales formulées au début du TP. L'atelier se déroule en 25h, et se décompose en trois parties : une partie théorique de 5h où sont présentés le thème scientifique ainsi que les différentes techniques d'exploration fonctionnelle. Les étudiants seront également sensibilisés aux bonnes pratiques de laboratoire et à la législation qui régit l'expérimentation animale au niveau européen (directive UE10/63 ; article 14 pour la prise en charge de la douleur et l'euthanasie des animaux et article 23 sur la compétence des personnels) et au niveau français (autorisation à l'expérimentation par un comité d'éthique depuis 2013). L'approche expérimentale est menée dans le respect de la règle des 3R et des procédures expérimentales visant à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des animaux. La partie pratique de 15h est dédiée à l'exploration comportementale et est distribuée sur trois demie journées de 5h. Pour chaque séance, les étudiants travaillent en 2 sous- groupes et sont distribués sur un des 3 appareils expérimentaux (mémoire, émotions, motricité), afin de pouvoir maîtriser chacun des tests comportementaux et bénéficier ainsi d'un enseignement de qualité. Une séance finale de 5 heures permettra aux étudiants de présenter leurs résultats sous forme de poster et de courte communication orale.

Cet atelier sera ouvert par session de 12 étudiants maximum. Les étudiants seront répartis en 2 groupes de 6 et réaliseront les différents protocoles expérimentaux sous la tutelle de 3 personnes habilitées (2 enseignants et 1 technicien), ce qui correspond à un taux d'encadrement de 3 à 4 étudiants par personnel formé. L'enseignant responsable et deux personnels formés à l'expérimentation animale, encadrent les étudiants répartis sur chacune des plateformes. L'accès des étudiants à la plateforme comportementale est soumis à réglementation avec un enregistrement et une acceptation temporaire écrits pour uniquement la durée de la séance et validés par le responsable de l'animalerie.

Les animaux utilisés pour cet atelier sont des rats de réforme. Le nombre d'animaux utilisé chaque année par session de 12 étudiants est de 30 rats (15 rats pour chaque sous-groupe). La demande d'autorisation porte sur 5 années, ce qui fait un total de 150 rats. Ce nombre sera revu à la baisse en fonction de nombre d'étudiant inscrits dans l'atelier.

13711 Le cancer du pancréas est la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de le dépister à un stade précoce et au moment du diagnostic, l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à développer de nouveaux agents d'imagerie pour imager et dépister le cancer du pancréas.

Après une étude minutieuse *in vitro*, deux nano-formulation d'agents d'imagerie basée sur des dendrimères amphiphiles ayant de nombreuses applications en biologie a été sélectionnée pour

l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les dendrimères sont des molécules synthétiques présentant des ramifications ressemblant à des branches d'arbres d'où leur nom. Les dendrimères amphiphiles ont la capacité de s'assembler et de former des structures sphériques appelées micelles dont la cavité peut servir à véhiculer un agent thérapeutique.

Il est primordial de tester *in vivo* l'efficacité et la sensibilité de ces nano-agents d'imagerie médicale qui pourraient être utilisés dans le dépistage/diagnostic, et le suivi des tumeurs pancréatiques, voire dans la délivrance ciblée d'un traitement si ces agents d'imagerie incorporent dans leur cavité une molécule anti-cancéreuse (application dite théranostique permettant à la fois le diagnostic par imagerie et le traitement).

Dans ce but, des souris saines seront utilisées pour évaluer la toxicité de ces agents ainsi que leur biodistribution dans l'organisme des animaux. Nous injecterons des cellules tumorales humaines à des souris NMRI NUDE afin de générer des xénogreffes à partir de cellules tumorales humaines qui seront ensuite explorées après injection intraveineuse d'un nano-agent de contraste, par imagerie par IRM, une méthode non-invasive utilisée en clinique permettant le suivi longitudinal d'un même sujet. Il sera ainsi possible de vérifier que le produit est retenu par les tumeurs pancréatiques à différents stades de développement et qu'il permet de détecter de façon précoce et spécifique les tumeurs.

Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Nous avons tenté d'utiliser toutes les méthodes substitutives possibles notamment les approches cellulaires, mais nous ne pouvons pas nous passer du recours à l'animal. Nous réduirons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de tests statistiques permettant d'optimiser la taille des effectifs, et nous raffinerons les procédures en diminuant autant que possible le stress et la douleur des animaux. Le nombre total d'animaux pour ce projet est estimé à 35 souris. L'implantation des tumeurs comme la procédure d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale en gazeuse (4% isoflurane) afin de réduire le stress et la douleur des animaux. Nous utiliserons des doses à faible impact neurologique afin de préserver le bien-être des animaux tout en évaluant l'efficacité et la sensibilité de nos nano-agents dendrimères pour l'imagerie.

Un délai d'acclimatation et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Le raffinement portera également sur les conditions d'hébergement (groupes sociaux, cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum) et l'enrichissement environnemental. Les souris seront hébergées dans des cages contenant des rondins de bois à ronger et un refuge afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, recherche de cachette...).

13712 Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant de lutter contre les principales maladies psychiatriques classées dans le groupe des troubles de l'humeur, notamment la dépression et les troubles anxieux. Certaines procédures peuvent également s'avérer utiles comme modèles en lien avec les troubles psychotiques, autistiques et de neurodégénérescence (Alzheimer, Parkinson, Epilepsie).

Les tests décrits dans ce projet sont des tests comportementaux qui permettent de tester l'efficacité d'anxiolytiques et d'antidépresseurs. Ces tests peuvent potentiellement générer du stress chez l'animal. Nous mettons alors tout en œuvre pour compenser ce stress généré (manipulation fréquente des animaux, mise en place d'enrichissement dans leur hébergement). Les procédures appliquées sont de gravité légère, à l'exception de procédures de catégorie modérée pour laquelle nous répétons les périodes de stress afin de développer des modèles de stress chronique et pouvoir tester l'efficacité de médicaments.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet ont été caractérisées de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de psychopharmacologie.

Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le comportement

animal de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 24500

Les procédures ne sont pas chirurgicales, nous ne nous attendons pas à des points limites spécifiques liés aux tests. Un suivi des points limites sera donc réalisé de façon non spécifique (indépendamment du modèle ou de la procédure), permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse pendant sa présence au laboratoire. Ces points limites incluent une surveillance de l'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, l'appétit, le poids, l'état d'hydratation, les tremblements ou convulsions.

13713 Considérées ensemble, les maladies oculaires caractérisées par des anomalies dans développement vasculaire de la rétine représentent la première cause de perte de vision irréversible dans les pays industrialisés.

Dans le cadre d'approches préventives des pathologies rétinienne, nous avons démontré que des lipides particuliers appelés « plasmalogènes » étaient impliqués dans le contrôle du développement vasculaire rétinien, et en particulier dans les étapes initiales impliquant les cellules gliales de la rétine. Ce projet vise à construire une stratégie nutritionnelle de contrôle du développement vasculaire rétinien par les plasmalogènes. Des expériences menées sur 860 souris (de génotype DAPAT, caractérisées par une déficience en plasmalogènes) permettront d'étudier l'influence d'un apport en précurseurs de plasmalogènes sur le développement vasculaire de la rétine.

Règle des 3R.

Réduction : bien que le nombre optimal pour les analyses de biologie moléculaire soit de 10 animaux par groupe en raison des fortes variations interindividuelles, nous n'utiliserons que 8 animaux par groupe, qui est le nombre minimal nécessaire afin d'avoir des différences significatives du point de vue statistique ; pour les analyses d'immunohistologie, qui sont non quantitatives, nous nous limiterons à 2 animaux par groupes.

Raffinement : afin de limiter la souffrance et le stress de l'animal, nous avons choisi d'exclure toute forme d'administration par injection ou par gavage. La supplémentation se fera par ingestion de croquettes enrichies. Le bien-être de ces derniers sera par ailleurs suivi par le personnel compétent du laboratoire selon le protocole établi par cette structure.

Remplacement : le projet vise à élucider un mécanisme complexe mettant en jeu l'interaction entre un organe très élaboré, la rétine (présence de nombreux types cellulaires différents, architecture complexe, vascularisation) ce qui exclut l'utilisation de modèles *in vitro* ou de modèles animaux inférieurs dont le métabolisme lipidique ou l'œil sont trop différents de ceux des mammifères.

13714 L'effet positif, sur la santé animale (souris) et humaine, de divers probiotiques a été démontré à plusieurs reprises, au niveau de l'amélioration du profil métabolique, mais également au niveau de la réduction de la prise alimentaire et ainsi dans l'aide à la perte de poids.

Les études réalisées chez le chat sont, elles, peu nombreuses. Il a, cependant, été montré que les chats obèses possèdent un microbiote différent de celui des animaux en condition corporelle optimale. Pouvoir modifier le microbiote d'un animal obèse et tenter de rétablir le microbiote d'un animal sain par l'utilisation de probiotiques ajoutés à la ration alimentaire constituerait un outil facilement utilisable dans cette espèce. Actuellement, au sein de l'Union Européenne, seul un probiotique, *E. faecium* SF68, peut être utilisé chez le chat comme le chien.

Notre étude cherche à montrer que d'autres microorganismes (formule confidentielle) pourraient également être utilisés, sans danger pour l'animal, et avoir des effets très bénéfiques et être considérés comme probiotiques. La preuve de l'innocuité est le préalable à ce projet et le but premier de cette étude. Le second objectif est de montrer la présence, dans les selles, des

microorganismes utilisés. Une étude ultérieure pourrait réunir des preuves de l'effet thérapeutique du mélange de probiotiques envisagé sur le syndrome métabolique et les problèmes de constipation chez le chat.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de la thématique de notre unité de recherche dont un des objectifs est d'identifier des thérapeutiques innovantes afin de lutter contre le syndrome métabolique.

Les chats recevront individuellement, chaque matin, durant 5 semaines, une petite fraction de leur ration quotidienne à laquelle sera ajoutée soit une dose de microorganismes (probiotiques présumés) soit le composé de charge (identique à celui utilisé pour le mélange de microorganismes). Suite à une période de wash-out de 21 j, les deux groupes seront inversés, la deuxième période expérimentale durera également 5 semaines. Plusieurs paramètres essentiels seront évalués tout au long de l'étude et le fait qu'ils ne soient pas affectés servira de preuve quant à l'innocuité du mélange utilisé.

Pour poursuivre cet objectif, nous sommes susceptibles de mettre en œuvre les procédures suivantes qui concerneront 12 chats : évaluation de la température corporelle, analyses sanguines (biochimie et numération formule) ainsi qu'une évaluation des coefficients de digestibilité alimentaire.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Le chat est l'espèce cible et il n'existe pas de modèle ou moyen alternatif qui ne soit pas *in vivo*.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique descriptive.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long du protocole par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées seront les plus adaptées pour réduire toute souffrance et tout dommage que pourraient ressentir les animaux. Les chats seront anesthésiés lors des prises de sang de façon à limiter le stress chez les animaux très craintifs.

13715 Dans la plupart des régions cérébrales, les neurones sont générés pendant l'embryogénèse. A l'inverse, dans le gyrus denté (GD) de l'hippocampe –une région clé pour la mémoire et la régulation des états émotionnels-, la majorité des neurones granulaires (NGs) est générée en période postnatale précoce et cette production neuronale se poursuit tout au long de la vie adulte, faisant du GD une structure singulière du cerveau.

La GD à l'âge adulte est donc composé de NGs d'origines ontogéniques différentes (embryonnaire, postnatale précoce et adulte) constituant des sous-populations de NGs qui pourraient jouer différents rôles dans la physiologie de l'hippocampe et contribuer différemment aux fonctions du GD. Étonnamment, cette hypothèse a reçu peu d'attention et bien que la plupart des NGs soient produits pendant le développement, on en sait peu sur leurs propriétés par rapport aux neurones nés à l'âge adulte.

Dans ce contexte, ce projet vise à mieux caractériser les NGs développementaux (nés en période embryonnaire et postnatale précoce) et à les comparer à ceux générés dans le cerveau juvénile et adulte. Au niveau morphologique, nous avons pu déjà montrer des différences au niveau de l'arbre dendritique. Nous cherchons maintenant à déterminer si ces différentes populations de NGs présentent également des différences au niveau de leurs épines dendritiques mais aussi au niveau de leurs terminaisons axonales. D'un point de vue fonctionnel, nous étudierons les propriétés électrophysiologiques de ces différentes populations.

Ce projet, en accord avec notre étude précédente, sera réalisée sur des souris Swiss/CD1. Les NGs générés en période embryonnaire (E14. 5) et postnatale (P0) précoce seront ciblés par électroporation *in vivo* tandis que ceux nés en période juvénile (P21) et à l'âge adulte (P84) le seront par injection stéréotaxique de rétrovirus. Dans les deux cas, des préparations d'ADN modifié permettant de visualiser les NGs et leurs structures (épines, terminaisons axonales) seront utilisées.

Les cerveaux injectés seront ensuite analysés à différents temps post-injection pour des études anatomiques (pour la morphologie) ou pour des études électrophysiologiques.

Pour ce projet, nous estimons utiliser 806 souris au total. Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Aussi, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons d'utiliser le nombre minimal de souris nécessaire pour obtenir des analyses statistiques fiables et cohérentes, nombre dépendant de la technique utilisée. Dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. N'existant pas de modèle *in vitro* permettant de reproduire l'environnement complexe caractéristique du gyrus dentelé, cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal *in vivo*.

13716 La neuroinflammation (NI) est un processus qui accompagne toutes les atteintes du système nerveux central, qu'il s'agisse d'atteintes aiguës telle que l'accident vasculaire cérébral, d'atteintes neurologiques chroniques telles que les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer ou de Parkinson), ou d'affections neuropsychiatriques telles que la dépression ou la schizophrénie. Les méthodes d'imagerie cérébrale, en particulier la tomographie par émission de positrons (TEP), permettent de détecter les anomalies dans l'organisme vivant, ce qui représente un atout précieux pour le diagnostic précoce et le développement de nouvelles approches thérapeutiques de toutes les affections cérébrales. Dans ce contexte, l'exploration de la NI par imagerie TEP est en pleine expansion. Ces dernières années ont vu le développement d'un grand nombre d'outils d'imagerie permettant d'explorer l'une des facettes de la NI, à savoir la sur-expression d'une protéine caractéristique de ce processus. Cependant, différents arguments indiquent que cette protéine n'est probablement pas la meilleure cible moléculaire pour évaluer finement la NI, et plusieurs équipes sont à la recherche de nouvelles cibles à explorer. Le projet présenté ici vise à évaluer l'intérêt de l'une de ces nouvelles cibles, dans la perspective de développer de nouveaux traceurs d'imagerie pour l'exploration de la NI. Pour répondre à cette question, nous projetons de vérifier que cette cible est bien sur-exprimée dans deux modèles de rats connus pour induire deux types différents de NI. En fonction des résultats nous sélectionnerons l'un de ces modèles dans lequel nous testerons de nouveaux traceurs de NI.

Nous estimons à 4 le nombre de nouveaux traceurs qui pourront être produits et donc testés en 3 ans, ce qui nous amènera à inclure un total de 80 rats mâles adultes de souche Wistar.

Cette expérimentation a été établie dans le respect de la règle des 3 R.

Remplacement : L'objectif final du projet est de développer des traceurs d'imagerie cérébrale pouvant être utilisés en clinique. Il est donc indispensable d'évaluer ces nouveaux outils *in vivo* chez l'animal, seule approche qui permettra de prédire leur passage au travers de la barrière hémato-encéphalique pour atteindre les protéines cibles reflétant la neuroinflammation.

Raffinement : Les animaux seront hébergés par deux par cage en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique et du papier absorbant. Afin de limiter la douleur les animaux recevront une dose d'analgésique 20 minutes avant la chirurgie, et seront surveillés toutes les deux heures après à la chirurgie, et recevront une nouvelle dose d'analgésique 24h post chirurgie.

Réduction : Dans les deux modèles de NI choisis, une injection cérébrale unilatérale est réalisée, ce qui permet de comparer le côté opéré au côté intact de chaque animal, et évite ainsi l'inclusion d'un groupe supplémentaire témoin.

13717 L'irradiation cérébrale garde une place importante dans le traitement de nombreuses situations pathologiques en cancérologie. Elle peut cependant induire des complications neurologiques sévères et invalidantes qui sont irréversibles. Il n'existe à ce jour aucun traitement préventif ni curatif.

La cascade des événements responsable de cette complication n'est pas clairement établie, notamment les étapes précoces qui vont induire les troubles cognitifs tardifs. Ce qui est

habituellement retrouvée est un dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) avec une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins qui pourrait être à l'origine d'une cascade de réactions inflammatoires conduisant à la destruction tardive du tissu nerveux. Les capillaires sanguins sont constitués de cellules endothéliales qui composent le tube et de péricytes juxtaposés qui entourent les capillaires sanguins pour les stabiliser. Des études récentes montrent que les péricytes ont un rôle essentiel dans la régulation de la BHE et dans le contrôle du flux sanguin en réponse à la demande tissulaire. Par ailleurs, nous avons montré que le ciblage de ces derniers par notre molécule d'intérêt, médicament déjà utilisé en médecine humaine pour d'autres indications permettait de stabiliser les capillaires sanguins et réduire les hémorragies chez les patients atteints de la Maladie de Rendu-Osler.

Notre premier objectif est d'étudier comment l'irradiation affecte la fonction des péricytes cérébraux. Le développement des complications radio-induites au niveau cérébral implique des interactions cellulaires complexes, entre les cellules endothéliales et les péricytes mais également entre les capillaires sanguins et le tissu neuronal –neurones et astrocytes- et les cellules immunitaires. Cette complexité ne peut aujourd'hui être reproduite *in vitro* et nécessite donc l'utilisation d'animaux notamment dans notre cas des souris génétiquement modifiées qui permettront de visualiser les péricytes, les cellules endothéliales, les astrocytes ou/et neurones en temps réel (souris exprimant un rapporteur fluorescent spécifiquement dans un type cellulaire), mais également de pouvoir facilement manipuler les voies de signalisation importantes pour l'interaction entre les cellules endothéliales et les péricytes (souris mutantes pour une voie de signalisation particulière). Pour mesurer comment l'irradiation cérébrale affecte les fonctions des péricytes, différentes approches technologiques peu ou non invasives seront utilisées et couplées. Elles comprennent l'imagerie 2-photons et doppler pour étudier les flux capillaires, les interactions cellulaires et l'activité neuronale à différents temps chez des souris préalablement irradiées ; des approches de mesures des propriétés de la BHE par injection de traceurs et analyse des tissus après sacrifice des animaux. Par des approches similaires, notre second objectif est de démontrer que notre molécule permet de prévenir les lésions neurologiques radio-induites en ciblant les péricytes.

Il est à noter que toute l'imagerie des animaux vivants permettant une analyse fonctionnelle post-irradiation sera réalisée par nos collaborateurs dans d'autres établissements et fera l'objet de demandes de projets distinctes.

Nous souhaitons démontrer que le ciblage des péricytes est une stratégie thérapeutique efficace dans la prévention des lésions cérébrales radio-induites et plus généralement de démontrer que la stabilisation du réseau capillaire sanguin est potentiellement prometteuse dans le traitement des maladies neuro-dégénératives.

Remplacer : Les péricytes et leurs fonctions ne peuvent s'étudier qu'en contact avec l'environnement cérébral global car leurs fonctions dépendent des interactions entre les péricytes et les cellules endothéliales, mais aussi entre les péricytes et les neurones, et entre les péricytes et les astrocytes. En culture, les péricytes se différencient rapidement en cellules musculaires. Les modèles de cellules en culture ne permettent pas de rendre compte de cette complexité. L'utilisation de souris, est indispensable pour cette étude

Réduire : Le nombre de souris utilisées dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est requis pour obtenir des résultats scientifiques et statistiques valides (3 840 souris). Notamment, il est indispensable de reproduire les résultats de façon indépendante, d'avoir plusieurs échantillons, et des animaux génétiquement identiques afin de minimiser les variations. Les tests statistiques utilisés consistent à comparer un paramètre variable entre deux groupes : test statistique Man Whitney ou t test non apparié. De plus, l'utilisation de souris exprimant des marqueurs fluorescents de différentes populations cellulaires nous permettent d'obtenir rapidement des informations conjointes et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner : Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soin et les méthodes utilisées sont en ligne avec les recommandations internationales afin de réduire au maximum souffrance, douleur, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Pour toute expérimentation

invasive, des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés, selon les recommandations établies.

13718 Les menstruations correspondent à l'élimination de la muqueuse interne de l'utérus, ou endomètre, à la fin d'un cycle hormonal chez la femme lorsque la fécondation n'a pas eu lieu. Ce phénomène physiologique normal est une caractéristique spécifique de certains primates dont l'être humain : il n'existe pas chez les autres mammifères, où la muqueuse utérine se résorbe sans saignements en fin de cycle. Les autres mammifères n'ont pas de menstruations (les chaleurs ont lieu au moment de l'ovulation et ne correspondent pas à un détachement de tissu).

Les gènes et mécanismes moléculaires impliqués dans la menstruation sont à ce jour mal connus et peu étudiés, notamment à cause de l'absence de modèles animaux adaptés. Or, la présence de menstruations s'accompagne de nombreuses maladies associées à cette élimination de la muqueuse utérine, dont la plus fréquente est l'endométriose. Cette maladie à large composante génétique affecte 5 à 10% des femmes avec de graves conséquences pour leur bien-être et leur fécondité, sans que ses causes soient identifiées à ce jour. Comprendre quels gènes et quels mécanismes moléculaires ont été mis en jeu dans l'évolution de la menstruation serait donc une avancée considérable d'un point de vue médical ainsi que pour comprendre nos origines évolutives.

Ce projet cherche à élucider les bases génétiques et fonctionnelles de la menstruation en comparant le tissu utérin humain à celui d'autres primates lors de la menstruation. En effet, la présence ou l'absence de menstruations ne suit pas l'arbre phylogénétique des primates : une approche de génomique comparative a donc un potentiel considérable pour détecter les modifications génétiques impliquées dans l'apparition des menstruations, tout en les séparant des différences résultant de la divergence évolutive entre espèces. Ce type d'études a déjà démontré son efficacité pour mettre en évidence les bases génétiques d'autres innovations évolutives chez les primates comme l'augmentation de la complexité du cerveau. Nous souhaitons examiner l'expression des gènes afin d'identifier les différences entre l'endomètre d'espèces présentant des menstruations par rapport à celles dont l'endomètre se résorbe sans saignements. Nous recherchons également les régions du génome qui régulent l'expression de ces gènes. Pour ce faire, nous proposons de comparer des échantillons de tissu endométrial humain sain avec des échantillons équivalents obtenus chez des primates qui menstruent (macaque, babouin) ou non (ouistiti, vervet), au moment de la fin du cycle menstruel.

Remplacement : La menstruation étant un trait spécifique aux primates qui ne peut être étudié sur des modèles *in vitro*, l'utilisation de modèles primates non-humains est indispensable dans le cadre de ce projet.

Raffinement : Nous prélèverons un échantillon de tissu utérin en une seule fois sur chaque animal, en réduisant au maximum le stress pour l'animal et l'invasivité du prélèvement (à partir des pertes menstruelles si possible). Si nous devons avoir recours à un prélèvement invasif (biopsie utérine sur les espèces ne présentant pas de menstruation), ce prélèvement sera réalisé sous anesthésie générale et couverture antalgique. Ce projet ne nécessite pas l'isolement d'animaux, ils seront donc hébergés dans leurs groupes sociaux d'origine. Toutes nos animaleries font l'objet d'un planning de mise à disposition d'enrichissements adaptés à chaque espèce. Les enrichissements sont soit structurels (divers perchoirs, balançoires...), périodiques (jeux de manipulations proposés selon un rythme hebdomadaire) ou alimentaires (graines dans la litière pour fourrageage, glaçons surprises, friandises...). Ce programme est supervisé par notre responsable du bien-être animal.

Réduction : Le nombre d'animaux concernés par la recherche est limité au nombre minimum de réplicats par espèce nécessaire à l'interprétation des résultats de l'étude à savoir 10 animaux/espèce soit 30 animaux au total.

13719 L'hématopoïèse est le nom donné au processus de production des cellules sanguines à partir de la cellule d'origine appelée cellule souche hématopoïétique. L'hématopoïèse nécessite la prolifération et la différenciation de ces cellules souches multipotentes, engendrant plusieurs générations de

progéniteurs et de précurseurs dont la différenciation terminale fournit les trois lignées de cellules sanguines matures : érythrocytes (globule rouge), leucocytes et thrombocytes.

L'hémoglobine des globules rouges est essentielle au bon fonctionnement du corps humain. En effet ces cellules sont indispensables pour la circulation de l'oxygène des poumons jusqu'au niveau des organes. Un déficit en hémoglobine peut entraîner une diminution de l'oxygénation dans tout l'organisme et une fatigue de l'organisme entier.

Lorsque le nombre de globules rouges atteint un niveau anormalement bas, le patient est déclaré anémique. L'anémie est fréquente au cours d'un cancer, on estime qu'elle survient chez 30 à 75 % des patients à différents stades de leur maladie. Elle peut être une conséquence du cancer ou bien du traitement par chimiothérapie. En effet, la chimiothérapie vise à éliminer les cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps, soit en les détruisant directement, soit en les empêchant de se multiplier. Cependant, ces traitements touchent également d'autres cellules saines ayant cette capacité à se diviser rapidement comme les cellules de la moelle osseuse qui fabriquent les globules rouges. Ainsi, les patients ayant subi une chimiothérapie développent fréquemment une anémie qui les affaiblit et représente un frein à leur rémission.

Dans ce contexte il est urgent de trouver une solution pour éviter ce mal bien trop fréquent chez les patients atteints de cancer. Nos résultats précédents, démontrent *in vitro* dans des modèles cellulaires, le rôle de la protéine GATA 1 dans la différenciation érythroïde et le contrôle de l'hématopoïèse. Nous avons également pu montrer que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques régulant positivement la protéine GATA1 permet de rétablir le poisson zèbre de l'anémie. L'objectif de cette demande est maintenant de démontrer que ce mécanisme est conservé au cours de l'évolution et de faire la caractérisation préclinique chez la souris de l'efficacité de ces inhibiteurs à potentiel thérapeutique dans le traitement de l'anémie.

Dans ce but, nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux tout en permettant de fournir des résultats statistiquement significatifs. Au total, nous planifions d'utiliser 80 souris C57BL/6. De plus, dans un souci de raffinement, le suivi de l'anémie induite par l'administration d'une chimiothérapie se fera par l'utilisation d'un analyseur hématologique utilisé pour le diagnostic vétérinaire compatible avec de micro-prélèvements chez la souris réalisés sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Les animaux seront suivis quotidiennement. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée à mener en fonction d'une grille de score du bien-être. Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions de leur hébergement, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 5 afin de respecter leur instinct grégaire.

Ces études seront essentielles pour prouver l'efficacité thérapeutique de deux nouvelles molécules et ouvrir la route à de nouveaux traitements cliniques de l'anémie.

13720 L'administration de médicaments peut se faire de diverses manières (ingestion, inhalation, absorption, diffusion ou injection).

Chaque mode de délivrance présente des avantages et des inconvénients et toutes les méthodes ne peuvent pas être utilisés pour tous les médicaments.

Dans le cadre du traitement contre le diabète de type 1, il est nécessaire de réaliser des administrations régulières d'insuline qui se font actuellement par injections sous-cutanées via différents dispositifs spécifiques (seringues, stylos, pompes, pancréas bioartificiel). Cependant, ces moyens thérapeutiques sont contraignants et engendrent des besoins médicaux non satisfaits, à savoir: injections douloureuses, non discrètes et pluriquotidiennes, parfois difficiles à faire soi-même pour les personnes à autonomie limitée.

Il s'avère que la délivrance intrapéritonéale (IP) est une voie d'administration prometteuse pour l'administration physiologique de plusieurs agents pharmacologiques, telle que l'insuline.

Un dispositif innovant est actuellement en cours de validation, il permettra l'administration d'insuline via un site pré-péritonéal par injection dans une chambre sous-cutanée. Ce dispositif nécessite néanmoins une chirurgie (laparotomie) et pourrait être amélioré pour être implanté par chirurgie

mini-invasive (coelioscopie). En effet, comparativement à la laparotomie, une implantation laparoscopique permettrait de réduire la taille de la cicatrice et le caractère invasif de l'acte chirurgical, donc de diminuer le temps de récupération post-opératoire ainsi que le nombre et la gravité des complications pouvant survenir a posteriori. Ceci améliorerait l'acceptance des patients vis-à-vis de la chirurgie nécessaire à l'implantation de ce type de dispositif.

Par ailleurs, afin d'ouvrir l'application de ce dispositif à d'autres traitements que le diabète (chimiothérapie par exemple), un autre site de délivrance que la voie IP, la voie muqueuse, permettrait un premier passage hépatique du médicament et donc sa métabolisation rapide. L'autre avantage du site sous-muqueux serait une administration ciblée à proximité des tissus péritonéaux.

Le site sous muqueux choisi est gastrique, l'estomac étant facilement abordable par laparoscopie

Sur la base ces données, le projet présenté ici a pour but de développer un nouveau dispositif de libération de médicaments qui soit implantable par chirurgie mini-invasive au sein du site sous-muqueux tout comme en pré-péritonéal.

Il est à ce stade nécessaire de s'appuyer sur un modèle chirurgical qui permette de valider (i) la procédure coelioscopique d'implantation/explantation du dispositif dans le site sous muqueux de l'estomac et (ii) de s'assurer qu'il est possible de réaliser l'implantation dans les 2 sites (sous muqueux et pré-péritonéal) lors d'une même procédure.

Le modèle porc a été retenu pour les homologues anatomiques de son système digestif avec celui de l'homme, et la possibilité de reproduire des gestes chirurgicaux en utilisant les mêmes instruments de laparoscopie que ceux utilisés chez les patients.

Ainsi, Une fois la procédure mini-invasive établie et validée avec utilisation de 4 animaux, la biointégration du nouveau dispositif et la tolérance des matériaux utilisés seront évaluées sur 12 animaux, en effectuant une comparaison avec l'implantation du dispositif initial, déjà reconnu biocompatible.

Au total, 16 animaux seront utilisés pour ce projet dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Le recours à l'animal est ici nécessaire pour étudier l'efficacité du nouveau dispositif dans la sous-muqueuse gastrique, la proximité physiologique existant entre le cochon et l'humain nous conduit à choisir cette espèce comme modèle pertinent. Des études préliminaires réalisées chez le rat ont déjà permis de valider l'absorption d'insuline au site sous-muqueux et l'avantage pharmacocinétique de ce site. La réalisation des expérimentations sur le porc constitue donc une étape indispensable afin de pouvoir envisager par la suite la mise en place d'essais cliniques chez l'Homme. Dans l'état de nos connaissances actuelles, il n'apparaît pas exister de revue de littérature ayant étudiées l'absorption de substances médicamenteuses au site sous muqueux et ayant permis la mise en place d'un modèle de remplacement (sur banc d'essai ou par simulation informatique).

Réduction : Le nombre d'animaux a été limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats significatifs statistiquement. Les résultats apportés par des études préalables sur le rongeur permettront notamment de réduire le nombre de porcs utilisés pour la présente étude.

Raffinement : Toutes les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale avec gestion de la douleur peropératoire. La surveillance et les soins aux animaux sont assurés par une équipe qualifiée de chirurgiens, vétérinaires et zootechniciens.

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans un environnement contrôlé (température et hygrométrie régulées), avec des enrichissements adaptés à leurs besoins comportementaux (jouets à mâchouiller, tapis de repos, ...), ils ont un accès ad libitum à l'eau et un régime alimentaire adapté à leurs besoins.

La structure en charge du bien-être animal accompagne le projet dans sa mise en œuvre, avec les conseils du vétérinaire qui prendra les dispositions nécessaires au maintien du bien-être des animaux.

13721 Suite à l'obtention de résultats très prometteurs montrant l'efficacité d'un traitement de thérapie moléculaire dans le cadre de la glycogénose de type 1a, une étude préclinique réalisée chez la

souris devrait permettre de proposer une thérapie pour les patients atteints de cette maladie génétique rare. Cette maladie est due à une perte de la production de glucose (sucre) par l'organisme. Cette fonction est assurée par le foie, les reins et l'intestin et permet le maintien de la glycémie (taux de sucre dans le sang) autour de 1g/l en dehors des périodes de repas. Ainsi, les patients atteints de glycogénose de type 1a développent des hypoglycémies sévères rapidement après un repas qui peuvent conduire au coma hypoglycémique et à la mort. En absence de traitement, ces patients doivent manger très régulièrement, y compris la nuit, en suivant un régime très strict pour éviter les pathologies associées à l'accumulation de glycogène (stock de sucre) et de graisses dans le foie et les reins. La plupart des patients développent un foie gras et des tumeurs hépatiques qui apparaissent chez le jeune adulte.

La preuve d'efficacité de la molécule utilisée pour la thérapie génique a été démontrée dans un modèle de souris unique qui reproduit toute la pathologie humaine hépatique de la glycogénose de type 1a, sans mourir de coma hypoglycémique. Cependant, ces souris ne peuvent pas utiliser leur stock de glycogène hépatique pour maintenir leur glycémie juste après un repas ; ainsi elles peuvent présenter des hypoglycémies modérées dans les premières heures de mise à jeun, mais elles sont capables de réguler ensuite leur glycémie si le jeûne se prolonge grâce à une induction de la production de glucose par les reins et l'intestin, organes non touchés par la maladie chez ces souris.

Lors d'une étude précédente, l'injection de la molécule étudiée, administrée par voie intraveineuse, a permis aux souris atteintes de glycogénose de type 1a (spécifiquement dans le foie) de diminuer significativement les stocks de glycogène hépatique après un jeûne prolongé de 24h et de réguler leur glycémie comme les souris non malades. L'efficacité du traitement est dépendante de la dose et a été maintenue pendant environ 10 jours. Avant de proposer une étude clinique, des études de toxicologie et de pharmacologie doivent être réalisées chez l'animal en utilisant la formulation la plus efficace.

Ce projet sera réalisé dans deux établissements différents. L'élevage des souris transgéniques atteintes de glycogénose de type 1a et les précautions prises pour éviter les périodes d'hypoglycémie seront décrits dans la première procédure. Après transfert dans le deuxième établissement, dans des conditions contrôlées et effectué par un transporteur agréé, les animaux seront traités par la formulation choisie afin d'effectuer des tests de toxicologie et de pharmacologie qui seront décrits dans une deuxième procédure.

Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacement :

Même si l'efficacité des molécules a déjà été validée dans ce modèle animal, il est nécessaire d'effectuer une batterie de tests chez l'animal pour établir la pharmacocinétique du médicament et de démontrer l'absence d'effets secondaires après injections répétées du produit.

Réduction :

Ces tests seront réalisés avec un nombre minimum de souris pour pouvoir valider l'utilisation d'un médicament ensuite chez l'homme (en phase 1/2).

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ces modèles animaux et du métabolisme glucidique (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'études précédentes ayant permis de valider l'efficacité du produit. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes d'un minimum de 8/10 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 155 souris mâles transgéniques et de 56 souris non transgéniques utilisées comme contrôles.

Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction ou incluses dans un autre projet.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. La connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites, en contrôlant les périodes de risque d'hypoglycémie. La nourriture est accessible dans les mangeoires mais aussi directement dans la cage pour assurer son accès aux souris qui

seraient affaiblies par une baisse de glycémie et qui ne pourraient pas atteindre les mangeoires. De plus, le temps de mise à jeun sera limité à 2h30 pour réduire le mal-être des animaux avant traitement. L'atteinte des points limites lors d'une mise à jeun entraîne l'injection de glucose et la renutrition immédiate de la souris. Pour limiter les hypothermies liées au développement des hypoglycémies, les animaux auront la possibilité de se réchauffer en disposant une partie de la cage sur une plaque chauffante lors des mises à jeun. Les animaux seront traités entre 2 et 6 mois après l'induction de la maladie hépatique. A ce stade, aucune atteinte hépatique délétère n'a été observée. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole dans le deuxième établissement ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces études réalisées chez la souris pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la glycogénose de type 1a. Au total, cette étude nécessitera 211 souris sur une durée de 1 an.

13722 *Toxoplasma gondii* (Tg) est un parasite microscopique intracellulaire fréquemment observé chez l'Homme (environ un tiers de la population mondiale infecté). Pendant la phase aiguë de l'infection, le parasite se multiplie dans l'organisme. Mais très rapidement (2-4 semaines après infection), un système immunitaire sain bloque la multiplication du Tg. Le parasite survit sous forme inactive dite latente (kystes) principalement dans le cerveau, l'œil, et les muscles tout au long de la vie des sujets infectés. Hormis contexte d'immunodépression et âge extrême de la vie, ces derniers ne présentent pas d'affections cliniques.

Alors qu'une infection par le Tg est considérée comme bénigne en général, les observations les plus récentes (animaux et humains) suggèrent fortement l'existence de liens entre l'infection par le Tg et certains changements comportementaux fréquemment observés chez les porteurs sains, comme une plus grande prise de risque, un plus grand taux d'accidents ou une tendance suicidaire plus marquée. Le présent projet a pour but d'étudier les modifications du système nerveux central (SNC) qui permettraient de comprendre les altérations comportementales observées après infection "bénigne" par le Tg. En particulier, nous étudierons les effets d'infection expérimentale de souris par le Tg (1) sur le cycle veille/sommeil et (2) sur les neurones particuliers du cerveau qui jouent des rôles importants dans de nombreuses fonctions cérébrales (vigilance, émotion, stress/relaxation).

1. Effets de l'infection par le Tg sur la régulation du cycle veille/sommeil.

Dans plusieurs maladies neurologiques (Parkinson, démences, sclérose en plaques), on observe des perturbations précoces du cycle veille/sommeil avant même l'apparition des symptômes caractéristiques de ces maladies. Ces perturbations précoces peuvent être considérées comme témoin de lésions cérébrales limitées, insuffisantes pour induire des symptômes neurologiques caractéristiques, mais suffisantes pour produire certains changements comportementaux tels qu'insomnie/somnolence, dépression ou fatigue. Il est ainsi possible que les altérations comportementales observées chez les sujets infectés par le Tg résultent de telles modifications limitées du SNC. Nous examinerons si ces modifications potentielles se traduisent par des perturbations du cycle veille/sommeil chez la souris infectée par le Tg grâce à des enregistrements électroencéphalographiques.

2. Effets de l'infection par le Tg sur les neurones impliqués dans la sphère émotive et la vigilance.

Le Tg peut potentiellement altérer la production des neurotransmetteurs dans certains neurones dits "monoaminergiques", jouant des rôles importants dans le contrôle de vigilance, attention, stress/relaxation, mais aussi dans certaines affections psychiatriques comme la dépression et la schizophrénie. Il est donc primordial d'étudier si ces neurones monoaminergiques sont infectés par le Tg et d'en étudier les conséquences fonctionnelles.

3. Principaux points de considération technique et pratique

3. 1 Sécurité microbiologique.

Nous disposons d'une animalerie de niveau de confinement adéquat A2. Cette animalerie héberge régulièrement des souris servant aux examens biologiques des échantillons cliniques humains

(liquides amniotiques) pour la présence de Tg infectieux. Nous réaliserons dans cette A2 tous les actes présentant un risque infectieux. Pour les manipulations ultérieures en dehors de l'A2, le Tg est chimiquement inactivé au préalable.

3. 2 Pour avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au mieux aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

- Remplacement : il n'existe pas de modèles informatiques pour étudier le cycle veille/sommeil des animaux, y compris les invertébrés. Les mammifères sont les seuls à posséder un cycle veille/sommeil semblable à celui de l'Homme. Nous avons choisi la souris comme sujet d'expérimentation puisqu'elle présente des rythmes circadiens proches de l'Homme et est susceptible d'être infectée par le Tg.

- Réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum. Nous prévoyons d'utiliser 160 souris, nécessaires pour nous affranchir de la variabilité inhérente à l'infection du SNC (4 séries indépendantes d'infection).

- Raffinement : notre modèle a été défini pour mimer une infection asymptomatique latente ("silencieuse") que l'on observe chez l'Homme. L'inoculation s'effectue par voie orale, celle principalement empruntée par le Tg chez l'Homme. Nous utilisons une souche de Tg type 2 non-virulente, majoritairement observée en Europe (souche "Prugniaud"). Afin d'éviter toute complication clinique, par exemple encéphalitique, nous inoculons nos souris avec le nombre minimal de parasites nécessaire à leur multiplication, nombre qui sera établi préalablement dans des expériences pilotes. Nos travaux nécessitent des observations sur des animaux vigiles et des interventions chirurgicales préparant ces observations. Le bien-être des animaux est pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Pour les actes chirurgicaux, le protocole a été optimisé pour supprimer toute souffrance physique et psychique per- et post-opératoire (anesthésie générale, anesthésiques locaux, anti-inflammatoires/antalgiques, suppléments eau/nutriments, compétence des personnels). Les conditions d'hébergement et de soins sont strictement contrôlées pour respecter les caractéristiques éthologiques de la souris (cycle jour/nuit, température, insonorisation, apport alimentaire et hydrique). L'animal est libre de ses mouvements pendant les mesures, selon les procédures conçues pour ne pas nécessiter d'intervention humaine directe, minimisant d'autant des stress inutiles.

13723 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. La prévalence de l'insuffisance cardiaque est très élevée dans le monde : selon la Société européenne de cardiologie, elle serait comprise entre 1 et 2 % dans les pays développés. La Fédération Française de Cardiologie estime qu'un million de personnes seraient touchées dans l'hexagone. On recense chaque année en France près de 70 000 décès liés à l'insuffisance cardiaque, et plus de 150 000 hospitalisations.

L'insuffisance cardiaque est liée à un affaiblissement du cœur qui n'est alors plus capable d'apporter la quantité de sang et de nutriments nécessaires au bon fonctionnement dans l'organisme. C'est une maladie symptomatique qui se manifeste essentiellement par une intolérance à l'effort, une apathie, une dyspnée et des œdèmes périphériques et pulmonaire.

L'insuffisance cardiaque fonctionnelle est un processus intégré et complexe qui n'est pas modélisable *in vitro* mais qui peut être étudié au laboratoire grâce aux modèles précliniques développés chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies pour l'homme.

Différents modèles d'insuffisance cardiaque mimant la pathologie humaine existent au sein de notre département. A l'heure actuelle, ces modèles sont classiquement induits par chirurgie ou par la mise en place des régimes spécifiques favorisant le développement des problèmes cardiaques (hypercholestérolémie, ...).

La Doxorubicine (DOX), couramment utilisée dans le traitement des cancers hématologiques et des tumeurs solides, présente comme principal effet indésirable une cardiotoxicité et est connue pour induire à long terme une insuffisance cardiaque.

L'objectif de ce projet consiste à mettre en place au sein de notre laboratoire, d'une part un modèle d'insuffisance cardiaque chez la souris induit de façon pharmacologique par injection de doxorubicine, et d'autre part un modèle « court » de mort cellulaire, pour l'étude et la sélection de nos futurs candidats médicaments.

Les propriétés de la doxorubicine vont permettre de reproduire au mieux les symptômes de la pathologie sur une espèce de petite taille et de disposer d'un modèle rapidement mis en place.

Les conditions expérimentales sont basées sur les données de la bibliographie ainsi que l'expertise et les premiers résultats obtenus dans le cadre de collaborations avec des partenaires extérieurs.

Modèle d'insuffisance cardiaque induit par injection de doxorubicine :

Sur le plan expérimental, l'induction du modèle d'insuffisance cardiaque sera réalisée par injection de doxorubicine chez la souris. Les effets de cet agent inducteur sur la fonction cardiaque seront évalués régulièrement au moyen d'imagerie clinique non invasive (échocardiographie) et ceci durant les 3 mois qui vont permettre le développement du modèle d'insuffisance cardiaque. Ces évaluations régulières seront réalisées sous anesthésie générale afin de limiter tout stress lié par exemple à la contention de l'animal.

Une fois le modèle mis en place et validé par un traitement de référence, il sera utilisé dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité de candidats médicaments. Seuls les candidats présélectionnés dans différents modèles cellulaires (*in vitro*) seront testés.

Modèle de cardiotoxicité aiguë induit par la doxorubicine :

Ce modèle, est induit par injection de la doxorubicine chez la souris *in vivo* avec une dose similaire au précédent mais une voie d'injection différente. Il vise à provoquer une cardiotoxicité aiguë et c'est un modèle court qui n'excédera pas 72h.

Ce modèle a pour but d'une part, la quantification des bio-marqueurs reflétant l'effet de la doxorubicine sur la mort des cardiomyocytes et d'autre part la réalisation d'une étude d'expression génétique permettant d'identifier l'implication de cibles d'intérêts dans ce mécanisme. Ce modèle vise ensuite une fois validé à évaluer l'efficacité cardioprotectrice de candidats médicaments dans un contexte de cardiotoxicité aiguë cette fois.

Pour ces 2 modèles, un suivi clinique rapproché des animaux sera effectué dans les heures qui suivent l'injection de la doxorubicine puis tout au long du protocole expérimental (modèle long et court) (poids, comportement, activité ...). En cas de constatation de signes de souffrance et d'atteinte de points limites prédéfinis, les souris seront soustraites de l'étude. En cas d'apparition de symptômes d'insuffisance cardiaque (apathie, intolérance à l'effort, dyspnée, œdèmes) les souris recevront en première intention un traitement diurétique tel qu'il est préconisé dans les guides de prise en charge de l'insuffisance cardiaque chez l'Homme.

Les souris seront maintenues en groupes sociaux tout au long des procédures expérimentales. Leur milieu sera enrichi de tubes de coton et de supports de bois à ronger afin de leur permettre d'exprimer leurs instincts de rongeur et de nidification. Cet enrichissement va également permettre de surveiller leur état général via leur comportement vis-à-vis de cet enrichissement et d'identifier rapidement tout signe anormal.

Ce projet prévoit l'utilisation de 1910 souris sur 5 ans. 840 animaux seront dédiés pour le premier modèle d'insuffisance cardiaque et 1070 souris pour le second modèle de cardiotoxicité aiguë.

13724 L'élément zinc (Zn) est à la fois un élément essentiel pour le métabolisme et un métal polluant pour l'environnement. Chez le poulet, une réduction du niveau d'apport en zinc peut conduire à une subcarence qui se manifeste par des dysfonctionnements, comme des retards de croissance ou des déficiences des fonctions immunitaires, pouvant mettre à mal le bien-être des animaux. La disponibilité du zinc alimentaire est très variable en fonction des sources de zinc utilisées et du niveau de calcium dans le régime. L'objectif de l'étude est de trouver des leviers pour optimiser l'utilisation digestive du zinc alimentaire chez le poulet. Les nouvelles stratégies permettront d'assurer la santé des animaux tout en réduisant l'impact environnemental. La teneur en Zn au

niveau du plasma, de l'os, des contenus digestifs et des fientes sera analysée pour caractériser la biodisponibilité du zinc alimentaire.

Un total de 180 poulets sera élevé en groupe au sol pendant 1 semaine. Au 7ème jour, 144 poulets de poids homogènes seront répartis en cages individuelles en vue de collecte des fientes. Les animaux non retenus repartiront en élevage.

Le protocole respecte le principe des 3R :

- remplacement : l'utilisation digestive et métabolique de zinc fait intervenir un ensemble de mécanismes complexes. La construction d'un modèle *in silico* ou *in vitro* pour prédire ces phénomènes n'est pas possible à cause du manque de données. Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

- réduction : le nombre d'animaux a été réduit à son minimum en tenant compte 1. de la distribution et l'homogénéité des poids des animaux attendues au moment de la procédure expérimentale et 2. De la puissance permettant de montrer une différence significative entre traitements et pertinente d'un point de vue biologique sur le critère de la solubilité du zinc.

- raffinement : Les poussins seront hébergés au sol en groupe pendant 1 semaine à une densité inférieure au maximum autorisé. Un minimum de 4 poussins par groupe est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins et respecter la taille moyenne d'une couvée. La durée de la procédure expérimentale sera limitée à 2 semaines. Des enrichissements appropriés du milieu de vie (au sol : petits perchoirs + balles en plastique et en cage individuelle : objets suspendus) seront mis en place. Les animaux seront visités au moins une fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera la mise à mort des animaux par le personnel qualifié.

13725 Dans son rapport présenté en février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé lance l'alerte sur le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques en développement et la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. L'OMS a également publié en 2017 sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients en réanimation ou immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris aux carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible (51% de résistance aux carbapénèmes en 2010 et jusqu'à 80% de résistance dans certains pays européens). De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii* sont grevées d'une mortalité hautement significative, à hauteur de 40%.

Par ailleurs, l'OMS met en avant la nécessité de mieux évaluer les antibiotiques dans des modèles précliniques pertinents. C'est dans cette perspective que le projet PulmoCRAB' s'inscrit qui est un modèle préclinique d'infection Pulmonaire aux formes Carbapénèmes-Résistantes d'*Acinetobacter baumannii*.

Dans un premier temps et dans le cadre de ce projet, 30 souches (sensibles ou résistantes) seront testées dans un modèle murin de sepsis afin d'en sélectionner 3, lesquelles seront ensuite évaluées dans un modèle pathologique innovant, discriminant et validé d'infection pulmonaire à *Acinetobacter baumannii* multi-résistant chez le lapin. Pour cela deux tailles d'inoculum seront testées. Ce modèle permettra une évaluation globale *in vivo* des composés actifs (curatifs ou préventifs) en développement.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 8 par groupe (au lieu de 10). Malheureusement, aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée pour cette étude. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance bi-quotidienne sera également réalisée pour cette étude (raffinement).

480 souris C57bl/6 sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet. Une analyse rétrospective sera réalisée à la fin du projet.

13726 La polykystose rénale autosome récessive est une maladie rare avec une incidence de 1/20000 naissances. Cette pathologie est caractérisée par un pronostic particulièrement sombre avec un taux de mortalité pouvant atteindre 20% pendant la période néonatale et, à moyen terme, une évolution vers l'insuffisance rénale terminale dans la moitié des cas avant l'âge de 10 ans. Sur le plan physiopathologique, il a été mis en évidence le développement de formations kystiques multiples au niveau rénal responsables de l'évolution vers l'insuffisance rénale terminale et donc la nécessité d'un recours à la dialyse et la transplantation rénale. A ce jour, aucun agent thérapeutique n'a fait preuve de son efficacité pour améliorer le pronostic rénal de ces patients.

Nos récents travaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle molécule, la mambaquarétine (MQ), permettant de ralentir la formation des kystes de par son effet antagoniste sur le récepteur V2 à la vasopressine. Ces résultats prometteurs doivent être validés sur le modèle animal de référence de polykystose rénale autosomique récessif : le rat PCK avec comme objectif futur, de conduire un essai thérapeutique chez l'homme.

Notre projet va consister, dans un premier temps, à trouver la dose minimale efficace de traitement à utiliser sans effet secondaire en comparaison avec le médicament connu-tolvaptan (100 anx). Dans un second temps, deux tests thérapeutiques sur 140 jours avec des animaux d'âges différents (4 et 10 semaines) seront réalisés pour comparer cette molécule avec le tolvaptan et voir son impact sur le développement de kystes rénaux et la préservation de la fonction rénale en préventif et curatif (80 anx). Nous utiliserons donc 180 animaux.

Ce nombre respecte la règle des 3R:

Remplacer: Les modèles cellulaires ont été utilisés en amont pour la caractérisation de la molécule et le modèle de rat PCK permet la validation *in vivo* de l'efficacité thérapeutique de la molécule sur la PKD ;

Raffiner : Avant de débiter les expérimentations, nous avons décidé de faire un programme d'apprivoisement et d'habituation consistant à une préhension et contention régulière diminuant ainsi fortement l'état de stress des rats lors du démarrage des protocoles. D'autre part, les animaux sont surveillés régulièrement (pesée hebdomadaire et appréciation de l'état général quotidien) afin de prendre en charge les animaux notamment par l'utilisation d'analgésique ou la sortie des animaux du protocole en cas de dépassement des points limites.

Réduire: Utilisation de 10 animaux par groupe pour objectiver statistiquement un effet thérapeutique, 7 doses pour trouver la dose minimale, efficace non toxique puis essais thérapeutiques à cette dose là en comparaison avec une molécule témoin (tolvaptan), les placebo et avec des animaux d'âge différents pour vérifier l'effet de la molécule en préventif (avant l'apparition des kystes) ou curatif (après l'apparition des kystes)

13727 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 17,7 millions de décès étaient imputables aux maladies cardiovasculaires (principalement les maladies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux) en 2017 soit 30% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces maladies cardiovasculaires, les patients insuffisants cardiaques présentent différents facteurs de risque dont l'hypertension, qui touche 60 à 70% des patients et demeure à ce jour un facteur de risque majeur associé au développement d'une insuffisance cardiaque (IC).

L'IC est un syndrome complexe qui se caractérise par la mise en place de plusieurs mécanismes physiopathologiques tels que l'hypertrophie et la fibrose cardiaque qui participent à leur tour à la progression et à l'aggravation de l'IC. Cette situation clinique n'est pas modélisable in-vitro. L'induction d'une hypertension artérielle associée à une hypertrophie et une fibrose cardiaque chez le rongeur est un modèle expérimental de référence pour l'étude du développement de la dysfonction cardiaque et de l'IC à long terme et la recherche. Les mesures des paramètres physiologiques (fonction cardiaque, la pression artérielle et fréquence cardiaque) sont réalisables

uniquement chez l'animal vivant. Il est important de pouvoir évaluer l'efficacité des candidats médicaments dans un modèle intégré qui récapitule au mieux la pathologie humaine. Le rat constitue un excellent modèle pour l'étude des mécanismes impliqués dans les pathologies cardiovasculaires. La souris nous permet d'accéder à des animaux transgéniques pour valider un mécanisme d'action ou une nouvelle cible thérapeutique.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle court et simple de dysfonction cardiaque induit par administration d'Angiotensine II, une hormone qui exerce une multitude d'actions biologiques au sein de différents organes et contrôle principalement la pression artérielle et le volume sanguin, chez le rat et la souris pendant 14 à 21j. Dans les conditions pathologiques, l'augmentation du taux d'Angiotensine II entraîne une augmentation de la pression artérielle (hypertension artérielle) associée à une augmentation du taux de collagène (fibrose) dans les organes cibles comme le cœur et le rein. Elle va également induire une augmentation de la taille du cœur (hypertrophie). Ce remodelage cardiaque serait responsable de la mise en place d'une dysfonction cardiaque qui peut progresser et mener à plus long terme à une IC.

Ce modèle d'hypertension artérielle associée à une hypertrophie et une fibrose cardiaque induit par administration d'Angiotensine II chez le rongeur est largement décrit dans la littérature.

Ce projet vise à :

- Tester chez le rat l'efficacité de nos candidats médicaments (administrés en préventif ou en curatif) sur la fonction et la morphologie cardiaque. L'utilisation de ce modèle pathologique chez le rat s'inscrira dans notre objectif de recherche et de validation de nouveaux candidats médicaments.
- Explorer des nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que comprendre des mécanismes physiopathologiques du modèle chez la souris, grâce à la disponibilité de modèles de génétiquement modifiés.

Pour les 2 espèces, la dysfonction cardiaque sera évaluée régulièrement par imagerie (échographie) et par le dosage de certains bio-marqueurs sanguins. A la fin du protocole expérimental, des mesures hémodynamiques (pression intraventriculaire gauche, pression artérielle, fréquence cardiaque) sous anesthésie générale pourront être effectuées. Des évaluations anatomiques, ex-vivo et in-vitro sont également envisagées sur les organes/sang prélevés en fin d'étude.

Le modèle que l'on souhaite mettre en place consiste à implanter, sous anesthésie, en sous cutanée, une mini-pompe osmotique délivrant d'une façon continue de l'Angiotensine II pendant 14 à 21j. Suite à cette phase chirurgicale très peu invasive, les animaux seront maintenus en groupes sociaux, dans un milieu enrichi de coton pour nidifier (souris) ou de cubes de bois à ronger (rat).

Pour les rats, et pendant la phase de mise au point du modèle, l'utilisation de la télémétrie (via l'implantation d'un émetteur par chirurgie préalable aux études et réalisée également sous anesthésie générale) pourrait être envisagée. La télémétrie est très utile pour la mesure de la pression artérielle à distance et sans aucune intervention vis-à-vis de l'animal vigile, maintenu dans son environnement habituel. Cette technique nous permettra de valider la dose d'Angiotensine II administrée et de compléter la surveillance des paramètres physiologiques en temps réel. La télémétrie constitue un bon moyen de raffinement lors de nos études expérimentales. De plus l'utilisation de l'échocardiographie comme outil de suivi longitudinal de la fonction et de la morphologie cardiaque nous permet de réduire les nombres d'animaux utilisés.

Une consultation statistique a été réalisée pour la conception des designs expérimentaux de chaque étape de ce projet ainsi que le nombre d'animaux par groupe. Ceci dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire au projet.

Une fois les modèles validés, seuls les candidats médicaments sélectionnés au cours des différentes étapes *in vitro* seront évalués.

L'état général des rats et des souris sera surveillé en post-opératoire et tout au long de l'installation de la dysfonction cardiaque afin de détecter tout signe de détérioration de l'état de santé de l'animal.

Tout au long du projet les Rats et les souris sont maintenus en groupes sociaux (excepté en cas de mesure télémétrie pendant la phase de mise au point chez le rat), avec un milieu enrichi avec des cubes de bois complété de coton pour que les souris puissent nidifier.

En cas de constatation de signes de souffrance, les animaux seront retirés de l'étude en fonction de points limites prédéfinis.

Ce projet peut être considéré de degré de gravité modéré car il vise à développer un modèle court d'hypertension artérielle associée à une dysfonction cardiaque comprenant une phase chirurgicale simple et peu invasive. Ce projet prévoit l'utilisation de 1164 rongeurs (rats et souris) sur une durée totale de 5 ans.

13728 Nos travaux ont pour objectif d'étudier les réponses immunitaires précoces mises en place par l'hôte en réponse à l'infection intramammaire à *E. coli* ou *S. uberis*.

Nous utilisons pour cela le modèle souris qui, bien que naturellement ne développant pas de mammites, reproduit certaines signatures immunologiques notamment le recrutement cellulaire. Les caractéristiques de la réponse protectrice induite lors de mammites sont comparables chez la souris et le bovin. Le recrutement cellulaire dans le lait est une signature majeure de l'infection de la mamelle. Nous étudions comment les cellules immunitaires arrivent et font évoluer l'infection. Nous caractérisons le rôle des cellules immunes innées, et des facteurs de l'hôte dans la mise en place et la régulation de la réponse immunitaire.

Pour comprendre le rôle de l'immunité innée au cours de l'infection il nous faudra :

- 1) Mettre au point du modèle d'infection mammaire murin par *S. uberis*, sur la base de notre expertise d'infection à *E. coli*.
- 2) Etudier des populations cellulaires recrutées et infectées dans la mamelle en réponse à *E. coli* ou *S. uberis*
- 3) Déterminer l'impact des populations de neutrophiles et de macrophages sur le devenir de l'infection

Ce projet pour 3 ans prévoit l'utilisation de 406 souris. Nous veillons à appliquer la règle des 3R :

-Remplacement : jusqu'à présent, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les caractéristiques d'infections de la glande mammaire et le modèle murin constitue un modèle expérimental pertinent.

-Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux, nous estimons à 15 % minimum la différence de nos moyennes et nous souhaitons une puissance de test de 90% minimum. Nous utilisons des souris consanguines dont la variabilité génétique est très faible. Nous utilisons des tests statistiques non paramétriques spécialement conçus pour comparer des groupes de petits effectifs. Un maximum d'analyses sera effectué sur chaque animal (cellules immunitaires, cytokines, expression des gènes, histologie, évaluation de la charge du pathogène). Nos groupes expérimentaux sont donc de 7 animaux de même âge.

-Raffinement : Les animaux seront hébergés par 2 dans des cages enrichies avec du sopalin. Nous réduisons, et limitons au maximum l'inconfort, la douleur, pouvant être subie par les animaux. Pour cela les animaux sont anesthésiés lors des infections et leur état général est suivi tout le long de l'expérimentation (poids, prostration...).

13729 Notre centre de recherche a pour mission de participer à la découverte et au développement de médicaments innovants pour soigner des pathologies humaines ou animales pour lesquelles les thérapies actuelles n'apportent pas de bénéfice thérapeutique suffisant pour les patients. Dans le cadre de cette mission, la pharmacocinétique, c'est-à-dire l'étude du devenir d'un composé dans l'organisme après son administration, est une étape indispensable et ceci quel que soit l'indication thérapeutique.

Les techniques utilisées dans les procédures expérimentales de ce projet permettent de mesurer la quantité de composé dans le sang, les excréta, la bile, les organes/ tissus après son administration unique ou répétées (voie intraveineuse, orale, topique, etc...). Les données ainsi générées

participent à l'identification des molécules ayant les propriétés pharmacocinétiques (PK) requises pour devenir un médicament efficace et sûr pour les patients. Ce projet peut également être utilisé pour des études de pharmacocinétique/ pharmacodynamique (PK/ PD) des composés. Ce type d'étude permet dans un même animal de faire le lien entre la quantité de composé présent dans l'organisme (exposition au niveau de la circulation générale, concentration au niveau du site d'action, etc...) et son efficacité avec notamment le suivi de biomarqueurs.

Seuls seront testés chez l'animal les produits susceptibles d'être intéressants en fonction de critères très spécifiques. La douleur de l'animal est bien intégrée dans la conception du protocole, et avec un minimum d'animaux possible.

Remplacement : Des modèles *in vitro* permettent d'étudier certains de ces processus et sont utilisés pour présélectionner les composés les plus intéressants mais aucun ne reproduit la complexité observée *in vivo*. C'est pourquoi l'évaluation chez l'animal des propriétés pharmacocinétiques des candidats médicaments chimiques ou biologiques est nécessaire, pour sélectionner le meilleur composé pouvant être progressé dans les études cliniques chez l'homme.

Raffinement : Les prélèvements sanguins sont de faibles volumes et se font majoritairement par simple piqûre à la queue afin d'être le moins invasif possible. Les volumes et fréquences d'administration et de prélèvement sont conformes aux bonnes pratiques et toutes les techniques sont réalisées par du personnel formé et compétent. Lorsque l'objectif scientifique de l'étude le préconise, des rats, équipés de cathéters au cours d'une chirurgie sous anesthésie générale peuvent être utilisés. Dans ce cas, une analgésie, un suivi adapté et des mesures post-chirurgicales sont mises en place pour prévenir la souffrance des animaux. Enfin, les prélèvements d'organes/ tissus sont réalisés après euthanasie ou sous anesthésie profonde au terme de laquelle l'animal ne reprend pas conscience. Dans tous les cas, les animaux sont observés régulièrement et des mesures sont mises en œuvre pour arrêter, minimiser ou diminuer la souffrance et/ ou détresse de l'animal en cas d'apparition de signe clinique indésirable.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est le plus faible possible en fonction des objectifs de l'étude. Dans le cadre des études pharmacocinétiques, 1 à 5 animaux par étude sont généralement utilisés en fonction de la voie d'administration du composé. Pour les études de PK/ PD, davantage d'animaux par groupe sont nécessaires afin d'obtenir un résultat statistiquement significatif ; une étude correspond dans ce cas à 50 animaux. Durant les 5 ans de ce projet, le nombre maximum d'animaux utilisés est estimé à 14075, soit par an 1837 rats, 918 souris, 30 hamsters et 30 gerbilles.

13730 L'augmentation de l'âge de la population entraîne une augmentation du nombre de cancers, et parmi eux, le cancer du sein triple négatif. Ce cancer évolue fréquemment vers l'apparition de métastases cérébrales. En raison de leur pronostic très sombre et d'une issue rapidement fatale, ces tumeurs cérébrales secondaires constituent aujourd'hui l'un des plus gros défis en oncologie. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) comme l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons (TEP) restent des techniques de référence pour le diagnostic de nombreuses maladies en particulier oncologiques. Cependant, dans le cas d'études précliniques sur petit animal, ces techniques d'imagerie restent limitées de part le manque de sensibilité et de résolution.

C'est pourquoi, notre laboratoire s'est tourné vers l'Imagerie par Bioluminescence. Cette dernière est la production et l'émission de lumière par un organisme vivant via une réaction au cours de laquelle l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse. En effet, notre plate-forme dispose d'une caméra permettant de visualiser et d'analyser le signal émis par les cellules tumorales transfectées nécessaires à l'utilisation de ce type d'appareillage. L'avantage associé à cette technique d'imagerie réside dans le fait qu'elle est non invasive, très résolutive, accessible et rapide à effectuer.

Afin de valider dans un premier temps le développement de cette technique d'imagerie pour le suivi de métastases cérébrales de cancer du sein, nous devons mettre en place un modèle *in vivo* de métastases cérébrales. Cette étape est indispensable à la suite de nos projets avant même de pouvoir passer à une stratégie de thérapie anti-tumorale.

Nous proposons de mettre en place 2 modèles sur des souris femelles nude : souris greffées en intracérébral par stéréotaxie par des cellules de cancer du sein ou après injection intra-carotidienne afin de proposer un modèle métastatique plus relevant. Dans ce cadre, l'étude sera réalisée sur 23 souris au maximum.

Une première étude *in vitro* a déjà été menée afin d'apporter une validation de concept et d'optimiser au mieux l'utilisation de l'imageur et des logiciels associés (REMPACEMENT), le but étant d'établir un protocole expérimental pertinent sur des lignées cellulaires tumorales transfectées. Nous devons maintenant évaluer la stratégie *in vivo*. Le REMPLACEMENT des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'utilité même d'une caméra à bioluminescence est de permettre un suivi *in vivo* dans le cadre du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

A cet effet, la mise en place de ces 2 modèles sera réalisée sur 23 souris femelles nude. L'évaluation de la cinétique de croissance tumorale sera évaluée par un suivi longitudinal des animaux par l'Imagerie par Bioluminescence permettant de réaliser les examens dans le temps sur un même animal et ainsi de réduire le nombre d'animaux (REDUCTION).

Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes seront effectuées (implantation de la tumeur, imagerie) et mises sous analgésie lors des procédures douloureuses (chirurgie pour l'induction de tumeur). En outre, les animaux seront mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (RAFFINEMENT) : apparition d'altérations fonctionnelles, perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffes, altération de l'aspect général de l'animal ou de son comportement. La durée de l'étude ne dépassera pas 11 semaines. Tous les animaux sont mis à mort à la fin de l'étude.

13731 Depuis les années 80, l'importance de la dosimétrie pour les études en radiobiologie a été mise en évidence ainsi que la standardisation et l'harmonisation des protocoles utilisés. Bien que de nombreux documents aient déjà été publiés pour les protocoles de dosimétrie, il n'existe pas de consensus et la diversité des pratiques posent également un problème de comparaison des données.

Dans ce contexte il apparaît essentiel de connaître avec précision la dose réellement reçue par le tissu ou l'organe que l'on étudie. Pour les études en radiobiologie, plus les conditions dans lesquelles les mesures de dosimétrie sont réalisées seront proches de la réalité plus les données acquises seront précises. Pour cela soit des animaux, dans lesquels des dosimètres sont placés, soit des animaux factices ou « fantômes » peu représentatifs de la réalité (cylindre mono-matériaux, ne prenant pas en compte les hétérogénéités de tissus existants dans les animaux) sont utilisés pour valider la dosimétrie.

Ainsi, ce projet propose de développer des fantômes dosimétriques multi densités adaptés aux études en radiobiologie afin de réduire voire de supprimer les animaux utilisés pour la mise en place et la validation des nouveaux protocoles de dosimétrie. Des fantômes de rats et de souris à différents âges seront développés afin de couvrir la plus large gamme de possibilités en adéquation avec nos projets de recherche.

Pour ce projet nous projetons d'utiliser 240 souris et 90 rats, soit un total de 330 animaux ; ce nombre d'animaux est nécessaire afin de couvrir la variété des modèles animaux utilisés dans le laboratoire. L'utilisation des animaux est nécessaire pour ce projet (réalisation des procédures d'imagerie) mais l'objectif à long terme est de pouvoir réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés pour les besoins de la dosimétrie, grâce aux développements de ces fantômes (qui remplaceront les animaux vivants pour la réalisation des dosimétries). De plus, certains animaux pourront être réutilisés pour d'autres projets (training par exemple). Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux animaux (pour les souris immunodéprimées : hébergement en IVC, procédures de manipulations) et aux procédures réalisées afin de limiter au minimum l'inconfort ou le stress chez les animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, hébergement en groupe avec enrichissement, application de points limites spécifiques, anesthésie pour la réalisation des procédures d'imagerie).

13732 Cette série de travaux pratiques a vocation d'enseigner les bonnes pratiques en expérimentation animale sur modèle rongeur (contention, préhension, prélèvement, analgésie, soins ...) dans le but de minimiser les contraintes exercées aux animaux. Cet enseignement est dispensé pour la formation spécifique destinée aux personnes appliquant des procédures chirurgicales sur modèle rongeur. Il prend place dans la réglementation (Directive 2010/63/UE Article 23 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques) qui définit l'adéquation des compétences du personnel par rapport à la fonction exercée et délivre une attestation valable pour le suivi des compétences.

Pour cette formation, les stagiaires mettront en pratique les notions abordées lors des cours théoriques qui précèdent les travaux pratiques. Ils réaliseront les différentes étapes d'apprentissage sous la supervision d'un ou deux encadrants.

Ce projet regroupe les différents travaux pratiques abordés lors de cette formation, et pour rendre le contenu plus lisible chacun est détaillé dans une procédure. Six TP sont réalisés lors de la formation « spécialisation en chirurgie ».

On estime le nombre maximum de 120 rats et 80 souris qui seront utilisés pour tous les TP pendant la durée totale du projet (5 ans) avec une session de formation chaque année. Ce chiffre est un chiffre maximum et peut varier à la baisse en s'adaptant au nombre de stagiaires.

Cet enseignement s'inscrit dans la démarche des 3R :

- Raffinement :

Une attention toute particulière est portée pour la diminution des contraintes exercées aux animaux.

Réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse :

Afin de limiter le stress, les animaux seront hébergés dans une animalerie en portoirs ventilés au moins une semaine avant les TP. Cet hébergement garni de litière et d'enrichissement (tunnel, nid en papier) leur permettra de reproduire des comportements naturels. Ils seront nourris et abreuvés ad libitum. Afin de minimiser l'angoisse de certains animaux dus au contexte d'une activité de formation (nombreuses personnes présentes), ceux-ci sont familiarisés à la manipulation par un technicien avant le déroulement du TP. Ils sont amenés dans la salle de TP au fur et à mesure des besoins.

Afin de réduire la douleur lors des actes chirurgicaux, ils seront anesthésiés avec un mélange xylazine et kétamine. Des injections de solution de lidocaïne sont administrées sur les trajets des incisions avant ouverture. Les animaux reçoivent un complément d'anesthésie si des signes de réveils deviennent perceptibles (rétractation en pinçant avec l'ongle l'intérieur d'une des pattes postérieures). Toutes les procédures sont classées sans réveil car à la fin de la pratique sur animal anesthésié, les animaux seront mis à mort sans souffrance avant leur réveil par injection d'euthanasiant.

- Remplacement :

Nous utilisons également une alternative à l'utilisation d'animaux vivants pour ces travaux pratiques, il s'agit du rat KOKEN. Le stagiaire peut ainsi apprendre les techniques de contention de l'animal, et l'intubation trachéale sur un rat mannequin. Les techniques de sutures sont réalisées sur de la peau synthétique pour lesquelles nous n'utilisons pas d'animaux vivants.

- Réduction:

Le nombre de rongeurs utilisés est calculé au plus juste (un animal par binôme/trinôme de stagiaires) et la quantité est toujours adaptée au nombre de stagiaires.

13733 Le curcuma est un remède ancestral dans la médecine indienne traditionnelle pour soigner les troubles biliaires, l'anorexie, la toux, les plaies diabétiques, les troubles hépatiques, les rhumatismes et la sinusite. Plus récemment, il a été démontré que la curcumine induisait l'inhibition de la croissance tumorale et l'apoptose dans diverses lignées de cellules cancéreuses *in vitro* ainsi que la diminution de la tumorigenèse *in vivo*. Ce composé polyphénolique a également été décrit comme ayant une activité anti-angiogénèse, processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La croissance tumorale, l'invasion tumorale et les métastases dépendent de l'angiogénèse.

Notre équipe a récemment développé au laboratoire un dérivé fluoré de la curcumine. Des tests *in vitro* ont montré un effet sur la viabilité cellulaire tumorale plus importante que la curcumine de synthèse. Une formulation micellaire composée de copolymères PEG-b-PCL ou PVP-b-PCL permet une encapsulation importante de curcumine et par conséquent de pouvoir injecter *in vivo* par voie intraveineuse cette molécule hydrophobe à des doses thérapeutiques. Cet analogue de la curcumine est facilement radiomarquable au fluor-18, isotope utilisé pour l'imagerie TEP (Tomographie par émission de positons). Nous pouvons ainsi évaluer la biodistribution de la molécule *in vivo* et faire également le suivi du traitement des tumeurs. Deux études précliniques seront menées en parallèle sur des souris présentant des xénogreffes de tumeurs fortement vascularisées (mélanome murin B16/F10 et glioblastome humain U251MG). Les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible pour pouvoir évaluer la biodistribution d'une molécule, 3 souris est le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette évaluation. Il ya 2 nanomicelles à tester (Une formulation micellaire composée de copolymères PEG-b-PCL ou PVP-b-PC) et un groupe contrôle négatif avec la curcumine seule marquée au 18F. Ces molécules seront testées sur deux lignées cellulaires cancéreuses comme indiqué précédemment. Ce qui représente un total de 18 animaux. Pour visualiser la biodistribution de cette molécule seule ou encapsulée dans des nanomicelles, l'utilisation d'animaux est indispensable. Le modèle murin est couramment utilisé en imagerie moléculaire des cancers. Les résultats *in vitro* ne peuvent suffire pour valider le ciblage de tumeurs de l'anticancéreux.

Les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris ad libitum et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale sous isoflurane à 2%. Nous avons choisi des points limites clés qui permettent de prévenir une détérioration de l'état clinique général de l'animal dans le but d'éviter une quelconque souffrance. Les points limites sélectionnés sont les suivants: perte de poids supérieure à 20%, déshydratation, immobilité de plus de 1 h (signe d'une douleur aiguë) et ulcération de la tumeur.

13734 Ce projet a pour but de caractériser le profil toxicologique chez des souris déficientes pour la G6PC dans le foie après l'administration de l'ARNm humain de la G6PC afin d'identifier les doses thérapeutiques qui pourront être utilisées chez l'Homme.

Avant de passer en phase clinique chez l'homme, des études plus précises pour déterminer la dose optimale à injecter n'entraînant pas de réponse immunitaire ni toxique, ainsi que les fréquences d'injection sont nécessaires. Ces études sont l'objet de la demande du présent projet. Ce projet est réalisé en collaboration une autre unité de recherche dont le projet a également été soumis et autorisé.

La glycogénose de type 1 (GSD1) est une maladie rare génétique héréditaire dans laquelle le métabolisme glucidique est altéré par la mutation d'une enzyme (glucose-6-phosphatase) aboutissant à une accumulation du glycogène dans le foie. Les conséquences de cette maladie sont lourdes, les patients atteints de glycogénose de type 1a développent des hypoglycémies sévères rapidement après un repas qui peuvent conduire au coma hypoglycémique et à la mort. En absence de traitement, ces patients doivent manger très régulièrement, y compris la nuit, en suivant un régime très strict pour éviter les pathologies associées à l'accumulation de glycogène (stock de sucre) et de graisses dans le foie et les reins. La plupart des patients développent un foie gras et des tumeurs hépatiques, ainsi qu'une maladie rénale chronique dès l'adolescence.

Des résultats très prometteurs montrant l'efficacité d'un traitement de thérapie génique dans le cadre de la glycogénose de type 1a ont déjà été réalisés en collaboration avec un laboratoire de recherche.

Afin de soumettre le projet aux autorités réglementaires, des études précliniques sont maintenant nécessaires et devraient permettre de proposer une thérapie pour les patients atteints de cette maladie génétique rare.

La preuve d'efficacité de la molécule utilisée pour la thérapie génique a été démontrée dans un modèle de souris unique qui reproduit toute la pathologie humaine hépatique de la glycogénose de

type 1a. Cependant, ces souris ne peuvent pas utiliser leur stock de glycogène hépatique pour maintenir leur glycémie juste après un repas ; ainsi elles peuvent présenter des hypoglycémies modérées dans les premières heures de mise à jeun, mais elles sont capables de réguler ensuite leur glycémie si le jeûne se prolonge grâce à une induction de la production de glucose par les reins et l'intestin, organes non touchés par la maladie.

Dans ce projet, nous proposons de qualifier le profil toxicologique de différentes doses dans un modèle de souris atteintes de glycogénose de type 1a spécifiquement dans le foie. L'évaluation de biomarqueurs (triglycérides, glucose, glycogène tissulaire, niveaux d'ARNm du produit dans les tissus and le sérum et niveaux de la protéine traduite dans les tissus) contribueront à la démonstration de l'efficacité du produit et du choix de la dose thérapeutique humaine dans le cadre de la soumission à l'autorité réglementaire.

Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacement :

L'efficacité des molécules à tester a été déjà validée *in vitro* en cellules mais seul le traitement des animaux atteints de GSD1 permettra de valider leur efficacité sur le tissu ciblé, c'est à dire le foie, ainsi que l'absence de réaction toxique après leur injection dans la circulation sanguine.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ces modèles animaux et du métabolisme glucidique (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes d'un minimum de 6-8 souris seront analysés. Le nombre d'animaux a été défini afin de présenter des résultats pertinents et statistiquement significatifs aux autorités réglementaires. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 144 souris mâles transgéniques et de 32 souris non transgéniques utilisées comme contrôles.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Les animaux seront placés en chambre chaude avant l'injection dans la veine de la queue ou seront légèrement anesthésiés avant les prises de sang. Pour la maladie hépatique, la connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites, en contrôlant les périodes de risque d'hypoglycémie. Généralement, les mises à jeun seront limitées à 2. 5h et 6h pour maintenir le bien-être des animaux non traités. Dans le cadre de prélèvements terminaux, les souris pourront être mises à jeun 24 heures avant prélèvement. L'atteinte des points limites lors d'une mise à jeun entraîne l'injection de glucose et la renutrition de la souris. Pour limiter les hypothermies liées au développement des hypoglycémies, les animaux auront la possibilité de se réchauffer en disposant des litières chaudes et des enrichissements dans leur cage. La température de la salle pourra être légèrement augmentée.

Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces études réalisées chez la souris pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la glycogénose de type 1a. Au total, cette étude nécessitera 176 souris sur une durée de 2 ans.

13735 Le cannabis est une des drogues la plus utilisée dans le monde (166 millions d'utilisateurs dont 15 millions de personnes dépendantes). Les cannabinoïdes, dont le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) est le principal composé psychoactif du cannabis, sont responsables des effets toxiques et addictifs du cannabis. Le THC va agir sur le cerveau, principalement sur les récepteurs des cannabinoïdes de type 1 (CB1). Une sur-activation des récepteurs CB1 va avoir des impacts neurologiques importants et peut être à l'origine de désordres psychiatriques et comportementaux liés à l'abus de cannabis.

Découvrir une thérapie pouvant atténuer les effets toxiques du cannabis est donc un enjeu de santé publique. Le but de notre projet de recherches est de comprendre comment est régulée l'action du cannabis (via l'action du THC) dans le cerveau, pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Il a été montré, chez le rongeur de laboratoire, un mécanisme de régulation qui se met en place dans le cerveau et permet de diminuer fortement les effets toxiques du THC. Un stéroïde (la pregnénolone) est produit dans le cerveau sous l'action du THC, et ce stéroïde va pouvoir se fixer sur les récepteurs CB1 pour modifier son activité et bloquer les effets toxiques du THC.

Notre stratégie de recherches est d'étudier une souris mutante, chez laquelle la pregnénolone ne peut pas se lier au récepteur CB1. Notre projet de recherche va consister à analyser les comportements et la physiologie de ces souris sous emprise ou non de THC, afin de comprendre comment la pregnénolone endogène régule l'activité CB1. Nous allons également tester des molécules de synthèse, qui ont une action similaire à la pregnénolone, pour déterminer leur mode d'action et ainsi préciser leur potentiel à être utilisé chez l'homme comme thérapie pour diminuer les effets toxiques du cannabis.

Nous allons étudier, chez plusieurs lots de souris, différents comportements communément étudiés chez la souris ainsi que des mesures de paramètres physiologiques dans le sang et le cerveau. Les résultats obtenus chez ces souris transgéniques seront comparés à ceux de souris contrôle (sans mutation du récepteur CB1).

L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 696 souris sur 3 ans.

Ce projet se fera dans le respect des règles des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement) :

(1) Remplacement : Des approches substitutives ont été réalisées en amont pour valider la mutation du récepteur CB1 et vérifier *in vitro* que la pregnénolone ne pouvait pas se lier au récepteur CB1 muté. Ce projet s'applique maintenant à des comportements intégrés qui ne peuvent être réalisés que chez l'animal. Nous utiliserons la souris, qui est un modèle pertinent pour son analogie à l'homme au niveau des processus génétiques, physiologiques et pathologiques. Ce modèle est largement utilisé en recherche expérimentale ; ce qui nous permet de connaître la faisabilité et les conditions appropriées des procédures expérimentales prévues dans ce projet. De plus, le modèle murin est le modèle animal communément utilisé pour pouvoir réaliser des mutations génétiques. Enfin, l'organisation du système nerveux central de la souris est assez proche de celle de l'homme, ce qui permettra une extrapolation à l'homme des résultats obtenus dans le projet de recherche.

(2) Réduction et Raffinement: les procédures expérimentales seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, il a été précédemment démontré la non toxicité (*in vitro* au niveau cellulaire et *in vivo* chez l'animal) de la pregnénolone et des molécules synthétiques testées dans le projet. Aussi, un phénotype normal (poids, comportement dans la cage d'hébergement) a été observé chez les souris mutantes au cours de leur développement jusqu'à l'âge de 3 mois. Dans un souci de respect du R de réduire, nous utiliserons au maximum 10 animaux par sexe et par groupe, ce qui permettra de pouvoir faire des analyses statistiques cohérentes pour comparer les groupes de souris (mutés versus contrôles et mâles versus femelles) et le maximum sera fait pour utiliser les mêmes animaux dans plusieurs protocoles expérimentaux. Aussi, dans le respect du R de raffiner, les procédures expérimentales utilisées seront peu invasives (et donc ne nécessiteront pas l'utilisation d'anesthésiques ou d'antalgiques). Les souris seront hébergées dans une pièce dédiée, avec régulation de température, d'humidité et de luminosité. Un enrichissement sera placé dans les cages d'hébergement pour que les souris fassent leur nid ; de plus les cages seront transparentes et rapprochées les unes des autres pour favoriser les contacts visuels et olfactifs.

Enfin, pour réaliser un suivi du bien-être des animaux, il y aura une observation quotidienne des animaux et des points limites ainsi que des critères d'arrêt seront définis pour chaque procédure. Si nécessaire, une modification du protocole adaptée à l'état de l'animal sera mise en place, comme par exemple des traitements appropriés (anti-inflammatoire, anti-douleur) selon l'avis du vétérinaire.

13736 Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour le pseudoxanthome élasticum (PXE). PXE est une maladie génétique rare se traduisant

principalement par une calcification progressive des fibres élastiques présentes dans les tissus conjonctifs tels que la peau, le système vasculaire et la rétine. Les patients présentent typiquement des papules jaunes (notamment au niveau du cou), des complications cardiovasculaires et ophtalmologiques causées par les calcifications. Chez les patients PXE, le risque d'infarctus du myocarde et d'hémorragies intestinale ou urinaire est augmenté.

La pathologie est due à des mutations dans le gène *Abcc6* (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 6), qui sont responsables in fine d'une diminution des niveaux de pyrophosphate (PPi) circulant. Or, le PPi est le principal inhibiteur des calcifications tissulaires et une baisse du niveau de PPi circulant est associée à une augmentation de la minéralisation tissulaire.

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif pour le PXE. Plusieurs traitements ont été évalués : l'Étidronate, une molécule utilisée dans l'ostéoporose, le sulfate de magnésium, et la vitamine K, mais aucun d'entre eux n'a permis de diminuer ou de stabiliser les calcifications. Un traitement symptomatique, pour limiter la dégénérescence oculaire est aussi administré chez les patients (antagonistes du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire).

Vu l'origine mono-génique de la maladie, un modèle murin de cette pathologie a été développé par invalidation du gène *Abcc6* chez la souris (*Abcc6*^{-/-}). Dans ce modèle, plusieurs organes et tissus sont affectés par des calcifications : la peau, les artères, la rétine, les reins, le cœur, les capsules des vibrisses. La minéralisation de la capsule des vibrisses apparaît dès 5 semaines, ce qui en fait un biomarqueur précoce de la pathologie. Le modèle murin *Abcc6*^{-/-} reproduit donc le phénotype de calcifications observé chez les patients.

Nous avons développé une stratégie thérapeutique qui consiste à utiliser un virus adéno-associé (AAV) qui exprime la protéine ABCC6 pour traiter les souris *Abcc6*^{-/-} (AAV-ABCC6). Les expérimentations consisteront à évaluer les effets de l'AAV-ABCC6 sur des souris *Abcc6*^{-/-}. Afin de répondre à la règle des 3R, nos vecteurs viraux ont d'abord été testés *in vitro* sur des modèles cellulaires (remplacement), afin de sélectionner les meilleurs candidats. 30 candidats thérapeutiques ont été testés à l'origine. De ces candidats nous avons retenus les 10 qui montraient la meilleure expression de la protéine ABCC6 fonctionnelle. Cela nous a permis d'économiser 240 souris (effectifs de 12 par groupe expérimental). Cependant, il est indispensable de tester l'efficacité de notre traitement dans un organisme entier car il est nécessaire d'évaluer dans le temps et de façon prédictive de la clinique l'effet au niveau des différents organes, notamment au niveau des organes et tissus ciblés (foie, reins, cœur, peau, vibrisses) et de valider l'absence d'effets indésirables sur les autres tissus.

Cette étude utilisera le minimum d'animaux possible pour avoir des résultats statistiquement interprétables (réduction). Afin de réduire encore le nombre d'animaux, nous procéderons par étapes en sélectionnant d'abord le candidat le plus prometteur, puis la dose, l'âge d'injection, au lieu de réaliser toutes ces études en même temps. De plus, nous évaluerons le maximum de paramètres requis sur les mêmes animaux après leur mise à mort dans la même expérience pour limiter leur nombre. Afin de minimiser la souffrance, lors des prélèvements sanguins, les souris seront anesthésiées sous isoflurane (raffinement).

Dans ces études, nous prévoyons d'utiliser 312 souris. Ce nombre est estimé en fonction d'une analyse statistique prédictive (test de comparaison des moyennes) afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible. Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 5 ans.

13737 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les potentiels effets d'un candidat médicament sur le transit-gastrointestinal et sur la vidange de l'estomac. La distance parcourue dans l'intestin par un traceur alimentaire précédemment ingéré par le rongeur est évaluée. Cette distance parcourue permet de calculer la vitesse de progression du traceur dans l'intestin grêle pendant un intervalle de temps donné. On visualise ainsi l'action d'un produit sur le transit gastro-intestinal et son potentiel à accélérer ou ralentir la vidange gastrique chez l'animal.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 960 rongeurs (600 rats et 360 souris).

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur le transit gastro-intestinal. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat et la souris sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera obtenu par :

- . le recours à des procédures les moins invasives possible
- . le suivi d'éventuels signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- . la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse

13738 L'infection par les herpesvirus tels que le cytomégalovirus (CMV) induit une infection latente persistante à vie. Ce virus infecte une grande partie de la population humaine dès le plus jeune âge, le plus souvent de manière asymptomatique. Des études récentes chez l'Homme et la souris montrent qu'une exposition à des facteurs environnementaux, et plus particulièrement les infections microbiennes, induisent une activation basale du système immunitaire. Ainsi, une préinfection par le CMV pourrait conférer une protection contre d'autres pathogènes.

Depuis plusieurs années nous utilisons le modèle murin d'infection par le CMV murin, connu pour sa pertinence et qui nous permet de répondre à des questions inaccessibles chez l'Homme. Notre laboratoire s'intéresse en particulier à la fonction de certaines cellules immunitaires appelées lymphocytes T. Il existe deux types de lymphocytes T : les alpha-beta et les gamma delta. Nous disposons pour nos études d'un modèle *in vivo* de souris déficientes en lymphocytes T alpha beta (TCRa^{-/-}) qui nous a permis de prouver le rôle protecteur des lymphocytes T gamma delta (LTgd) contre le CMV murin (mCMV). Chez les souris TCRa^{-/-}, le nombre de cellules LTgd augmente dans les organes cibles de l'infection à CMV (notamment le foie et les poumons) concomitamment à une diminution de la charge virale.

Notre but actuel est de tester si une préinfection par le CMV peut activer les LTgd et ainsi conférer une protection à long terme contre d'autres infections pulmonaires. Il n'y a pas d'alternative à au modèle animal pour répondre à cette question car aucun système *in vitro* ou *in silico* ne permet de reproduire la complexité cellulaire ou moléculaire permettant de répondre à la question.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 1980 animaux sur 5 ans.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

- Remplacement : Jusqu'à présent, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les caractéristiques d'infections respiratoires. Le modèle murin constitue un modèle expérimental pertinent. Les modèles animaux sont donc nécessaires et irremplaçables.

- Réduction : Le nombre d'animaux est optimisé en réalisant un maximum d'analyses sur chaque animal. Nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires. De plus nous utilisons les animaux mâles et femelles ce qui réduit de 50% l'utilisation des animaux et nous éviterons toutes répétitions inutiles de nos expériences.

- Raffinement : le bien-être de nos animaux sera pris en compte depuis leur naissance. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. A ce titre, l'ensemble des cages est enrichi en matériaux permettant aux souris de nidifier. De plus nous limiterons la douleur, le stress ou

l'inconfort des animaux par l'utilisation de procédures et des traitements à anesthésiques ou analgésiques adaptées.

13739 Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, le rôle des astrocytes et leurs interactions avec les neurones reste méconnu. Néanmoins, les données récentes suggèrent qu'ils seraient aussi impliqués dans le contrôle des états comportementaux et des fonctions cognitives et dans certaines situations pathologiques. Une meilleure compréhension du rôle modulateur des astrocytes sur les activités neuronales améliorera donc notre compréhension du fonctionnement du système nerveux central en conditions normales et pathologiques. Nous avons récemment mis en évidence qu'une protéine appelée VMAT2 joue un rôle important dans les astrocytes pour réguler les activités cérébrales. Le présent projet vise à comprendre comment cette protéine permet un tel contrôle. Dans ce contexte il est nécessaire d'utiliser un tissu nerveux intact afin de détecter les processus physiologiques impliqués. Effectuer cette étude sur un système *in vitro* aboutirait à une étude de processus non-physiologiques et ne serait donc pas pertinent. La souris est un petit mammifère dont le système nerveux central présente de nombreuses analogies avec les mammifères supérieurs (dont l'humain). La grande maîtrise des méthodes d'élevages, des conditions de bien-être animal et la haute standardisation des lignées en fait un organisme de choix pour une étude physiologique des interactions neurogliales. De plus, chez cette espèce, les techniques de modifications génétiques ont été optimisées et il s'agit de la seule espèce ou un organisme n'exprimant pas VMAT2 dans les astrocytes est disponible. Ainsi, les activités cérébrales de souris exprimant et n'exprimant pas cette protéine VMAT2 seront étudiées. Sur 5 ans, 320 souris seront utilisées. Ce nombre a été rationalisé à partir de statistiques de puissance. L'ensemble des expériences sera effectué par des personnes habilitées tout en respectant le bien-être animal en veillant en particulier à limiter un maximum la douleur. Pour ceci le sacrifice des animaux sera dans la mesure du possible effectué par utilisation d'anesthésique (Euthasol) à dose létale. Cette étude permettra d'identifier un nouvel acteur dans les modulations dopaminergiques du cortex préfrontal et donc une nouvelle cible thérapeutique contre les maladies impliquant des dérégulations dopaminergiques du cortex préfrontal telles que la schizophrénie ou la dépression.

13740 L'arthrose touche plus de 70% des sujets âgés de plus de 70 ans. Cette pathologie touche les articulations dans leur ensemble : dégradation du cartilage, inflammation de la membrane synoviale et formations osseuses anormales.

Actuellement il n'existe que des traitements palliatifs de la douleur, mais aucune thérapie ne permet encore de restaurer des fonctions articulaires normales ni même de bloquer le processus arthrosique. L'arthrose étant notre principale source d'intérêt scientifique, il n'en demeure pas moins qu'il existe à ce jour plusieurs autres pathologies ostéo-articulaires au moins aussi complexes qui ne connaissent elles non plus aucun traitement.

La thérapie génique est une stratégie innovante qui permet le transfert d'acides nucléiques clés aux cellules atteintes afin de restaurer un phénotype cellulaire sain qui semblerait être une piste pertinente pour le traitement de différentes maladies ostéo-articulaires. Parmi les vecteurs disponibles, les virus adéno-associés recombinants (AAVr) constituent un outil de choix. Pour autant, l'articulation présente deux principaux obstacles à l'utilisation d'AAVr : l'accessibilité des cellules du cartilage, et la neutralisation des virus par le liquide synovial.

De manière à potentialiser cette stratégie, l'utilisation d'AAVr de différents sérotypes et modifiés chimiquement par l'ajout d'un ligand à la surface de leur capsid sera éprouvée. Les modifications chimiques induisent une modulation des propriétés physico-chimiques de l'AAVr permettant ainsi un meilleur accès aux cellules enchâssées dans une matrice extracellulaire dense mais aussi un masquage de l'AAVr pour éviter les réponses du système immunitaire.

Des premiers tests seront effectués sur différents types de cellules en culture pour évaluer l'effet de la modification chimique sur le vecteur et l'efficacité de transduction de ces différents sérotypes *in vitro*. Cependant, les modèles *in vitro* ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions

entre le vecteur et l'environnement biologique *in vivo* et rendent donc difficile la reproductibilité de ces résultats *in vivo*. Il est également impossible de vérifier la bio distribution ou encore l'index thérapeutique de ces particules modifiées sur des cellules en culture. L'utilisation de la souris est donc ici justifiée pour évaluer ces deux paramètres *in vivo*.

La procédure expérimentale n°1 a pour objectif de comparer, le tropisme, l'efficacité de transduction ainsi que la neutralisation de différents sérotypes d'AAVr dans les différents tissus de l'articulation par des techniques histologiques et moléculaires (RT-qPCR). L'apport d'une modification chimique sur l'un de ces sérotypes sera évalué dans le but d'observer s'il engendre une modification du tropisme, de l'efficacité de transduction et/ou de la neutralisation.

L'injection intra articulaire d'AAVr modifiés ou non permettra de choisir le vecteur présentant les meilleures caractéristiques, à savoir, un tropisme spécifique à l'articulation et une moindre neutralisation. Les résultats obtenus permettront de faire un choix avisé du sérotype en fonction de la pathologie ostéo-articulaire en question et des cellules ciblées par la stratégie de thérapie génique mise en place.

Pour l'étude, 8 souris dans chaque groupe seront injectées par voie intra-articulaire avec un sérotype d'AAVr codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) dans chacun des 2 genoux. L'un servira alors aux études histologiques et l'autre aux études moléculaires. Les groupes injectés le seront avec les sérotypes de type 1, 2, 5, 8, 9, 10 et le variant DJ, ainsi que le sérotype 2 modifié par l'ajout de ligands mannose. Un groupe contrôle de 8 souris injectées à une dose similaire à l'AAV2 modifié sera nécessaire. Un dernier groupe de 8 souris contrôle sera injecté avec une solution de chlorure de sodium (NaCl). Ce projet utilisera donc 80 souris C57BL/6J mâles.

Ce projet prend en compte la règle des 3R :

- Le nombre d'animaux a été réduit au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique : soit 8 animaux par groupe pour la procédure expérimentale n°1 ce qui fait un total de 80 souris.

- Le raffinement est mené en réduisant la douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Ainsi, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine en pré et post-chirurgie ainsi que l'ajout de meloxicam dans l'eau de boisson pendant 3 jours post-chirurgie. Les souris seront hébergées à raison de 4 souris par cages. Elles seront observées et pesées quotidiennement la première semaine après la chirurgie puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place pour réduire la douleur lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites.

- Malheureusement, le remplacement de cette expérimentation animale par un modèle *in vitro* est impossible, car cette étude vise à comparer le tropisme, l'efficacité de transduction, la bio distribution ainsi que la neutralisation de différents sérotypes d'AAVr *in vivo*. Or bien que l'efficacité de transduction des AAVr peut être étudiée *in vitro*, les résultats obtenus *in vitro*, sont généralement très éloignés des efficacités de transduction *in vivo*. Nous ne pouvons donc pas extrapoler les efficacités de transduction obtenus *in vitro* à *in vivo*. Il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation d'animaux pour ce projet.

13741 L'aspergillose pulmonaire invasive est une infection sévère due à un champignon du genre *Aspergillus*. Elle survient classiquement chez des patients immunodéprimés suite à l'inhalation des spores du champignon, qui voient leur état général se dégrader rapidement, sans amélioration sous traitement antibiotique, ce qui aboutit au décès du patient après un diagnostic parfois trop tardif. L'arsenal antifongique actuel reste limité et les molécules disponibles présentent des effets indésirables ainsi que de nombreuses interactions médicamenteuses qui complexifient la prise en charge thérapeutique de ces patients polymédiqués (chimiothérapies, molécules anti-rejet du greffon). L'émergence de souches résistantes de ce champignon dans l'environnement et chez les malades renforcent la nécessité de développer de nouvelles stratégies antifongiques. Chez les patients à risque (immunodéprimés en particulier), la chimioprophylaxie est largement utilisée. Elle

fait appel aux mêmes principes actifs que les traitements curatifs, exposant au risque d'apparition de résistance et compromettant la prise en charge thérapeutique en cas de nécessité.

L'intérêt d'une approche prophylactique visant à inhiber l'adhérence du champignon à la surface des bronches et/ou des alvéoles a déjà été démontré *in vitro*. Ces résultats doivent être confirmés chez l'animal. Parmi les modèles animaux décrits dans la littérature, le modèle murin d'aspergillose pulmonaire invasive (infection par voie trachéale de souris immunodéprimées pharmacologiquement) est le plus pertinent pour notre étude, et notre laboratoire le maîtrise.

La première procédure permettra de prouver l'activité inhibitrice des nouveaux composés sélectionnés après l'étude *in vitro* (maximum 320 souris).

La seconde partie de l'étude vise à déterminer l'activité prophylactique *in vivo* des nouveaux composés ayant déjà fait la preuve de leur efficacité dans la première procédure (maximum 665 souris).

La dernière procédure a pour but d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de ces nouveaux traitements en combinaison avec les traitements actuels (maximum 640 souris).

Au total, au maximum, 1625 animaux seront utilisés.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer l'efficacité *in vivo* de cette stratégie d'inhibition grâce au suivi de l'évolution clinique des animaux, une étude anatomopathologique, la mesure de la charge fongique pulmonaire et le dosage d'un marqueur fongique circulant.

Les souris Swiss seront hébergées en groupe, dans un environnement enrichi. Les protocoles expérimentaux ont été établis afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux nécessaires.

Le suivi de l'évolution de la maladie par la recherche dans le sang d'un marqueur de l'infection fongique ainsi que l'évaluation de la charge fongique dans les poumons permettent d'améliorer la qualité de l'étude de l'activité antifongique et donc de raffiner nos procédures. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'autres méthodes d'évaluation de l'activité prophylactique antifongique que l'étude sur des animaux rendant actuellement leur remplacement impossible. La durée maximale du conditionnement immunosuppresseur sera de 5 jours.

La souffrance animale sera évaluée au cours du suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un "score de points critiques" dépassant le seuil défini sera euthanasié.

13742 Le Syndrome de Down (SD) aussi appelé Trisomie 21 (T21), est dû à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Ce syndrome touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphies ou malformations. Parmi les gènes candidats à l'apparition de ces symptômes, un gène présent sur le chromosome 21 humain et donc en 3 copies chez les sujets porteurs de la T21, est aujourd'hui une des cibles privilégiées pour le développement de traitements thérapeutiques. Les études de ce gène chez la souris ont démontré son implication dans le développement crânio-facial et le développement et la maturation du cerveau. En effet, les souris ayant une copie supplémentaire de ce gène présentent des anomalies crânio-faciales ainsi qu'une altération des capacités d'apprentissage et un déficit de la mémoire similaire à celles observée dans la T21.

Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients atteints de la T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. L'objectif de la recherche sur la T21 est donc de mettre au point un traitement améliorant les fonctions intellectuelles des patients.

Des collaborateurs proposent des composés ayant la propriété d'améliorer les capacités cognitives qui sont altérées dans cette pathologie en ciblant l'activité de notre protéine d'intérêt. Durant ce projet, nous souhaitons déterminer le composé parmi 2 candidats (composés 1 et 2) qui se révélera le plus efficace en termes de restauration des fonctions intellectuelles. Ces composés seront synthétisés et testés pour l'ADME pharmacologique (administration, distribution, métabolisation et excrétion) par nos collaborateurs. Ces composés seront ensuite administrés par notre équipe à des

souris modèles de T21 et à des souris sauvages dans le but de s'assurer qu'ils n'ont pas d'effet toxique. Les souris traitées feront l'objet de différents tests comportementaux afin de détecter une amélioration de leurs performances cognitives. Par la suite, le composé induisant la meilleure amélioration des performances intellectuelles des souris trisomiques, sera testé sur un modèle de rat de la trisomie 21.

REMPACEMENT :

L'utilisation de la souris et du rat dans cette étude est justifiée par le fait que les anomalies à observer (altération des capacités d'apprentissage et déficit de la mémoire) nécessitent un modèle vivant et suffisamment proche de l'homme pour pouvoir être transposées à l'espèce humaine. De plus, sachant qu'il existe des différences inter-espèces il est intéressant de comparer les résultats entre les 2 organismes afin de généraliser les résultats si ces derniers sont similaires.

RAFFINEMENT :

Les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Et dans le cas où les animaux présenteraient des signes de souffrance, de mal-être, ou de douleur, ils seront exclus des analyses et soignés ou euthanasiés selon leur état.

REDUCTION :

Pour ces tests, des rongeurs mâles et femelles seront utilisés à partir de 12 semaines, âge équivalent au jeune adulte. Nous utiliserons et testerons les deux composés sur les deux sexes afin de vérifier qu'il n'y a pas de différence entre mâle et femelle. De plus, le traitement sera aussi effectué sur des animaux sauvages dans le but de vérifier qu'il n'y ait pas d'effet toxique.

Le test statistique utilisé sera le test de Student pour des groupes non appariés avec comparaison de moyennes des différents groupes à une constante spécifiée, ici 50% correspondant à une performance au hasard. Entre 12 à 16 animaux par groupe sont nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante.

Dans un premier temps, nous aurons besoin de 6 groupes d'étude afin de discriminer le meilleur des deux composés pharmacologique testés :

- Souris contrôles sauvages non traitées
- Souris contrôles sauvages traitées avec le composé 1
- Souris contrôles sauvages traitées avec le composé 2
- Souris contrôles trisomiques non traitées
- Souris trisomiques traitées avec le composé 1
- Souris trisomiques traitées avec le composé 2

Dans un second temps, il nous faudra 4 autres groupes afin de tester le meilleur des deux composés sur un autre modèle murin de la trisomie 21, le rat :

- Rats contrôles sauvages non traités
- Rats contrôles sauvages traités avec le composé X
- Rats contrôles trisomique non traités
- Rats trisomiques traités avec le composé X

Sachant que cette étude nécessite au total 10 groupes d'études par sexe (6 groupes de souris et 4 groupes de rats), il nous faudra donc 320 animaux au maximum dont 160 mâles et 160 femelles (maximum de 16 individus par groupe et par sexe, sachant que l'on a $n = 6 \text{ groupes} \times 16 \text{ individus} \times 2 \text{ sexes} = 192 \text{ souris}$ et $n = 4 \text{ groupes} \times 16 \text{ individus} \times 2 \text{ sexes} = 128 \text{ rats}$).

13743 Problème majeur de santé publique avec 382 000 nouveaux cas estimés en 2018, les cancers sont la première cause de décès prématuré avant 65 ans en France. Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proches de l'Homme, permettant d'évaluer *in vivo* l'interaction de ces cellules avec leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyse *in vitro*, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle de ces gènes au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons pour l'année à venir d'utiliser 417 souris.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

13744 L'effet incrétine correspond à une augmentation plus marquée de l'insuline circulante à la suite d'un repas par rapport à celle consécutive à l'administration veineuse d'une quantité identique de glucose. Des données récentes montrent que cet effet est réduit chez le patient diabétique. Le rôle central de l'effet incrétine dans le contrôle de la glycémie conduit à rechercher une espèce modèle qui présente une réponse quantitative proche de celle de l'homme. Les essais préliminaires chez le chien et les rongeurs de laboratoire menés en Allemagne par notre partenaire ont été infructueux. Le porc pourrait être un modèle alternatif et le but de notre projet est donc d'évaluer la pertinence de ce modèle en conditions physiologiques avant de confirmer la suppression de l'effet incrétine chez le porc diabétique.

Sachant que l'objectif final du projet est de disposer d'un modèle animal de l'effet incrétine humain, il est essentiel de réaliser les mesures de sécrétion d'insuline dans des conditions identiques à celles décrites chez l'homme et notamment au travers du suivi de la sécrétion d'un peptide co-sécrété avec l'insuline et qui sert de marqueur à cette dernière. Nous nous proposons donc d'évaluer la sécrétion d'insuline avec la méthode dite des « trois jours » qui correspond à ce jour au standard international pour la mesure quantitative de l'activité incrétine chez l'homme. Cette méthode suppose (i) la mesure de la sécrétion d'insuline au cours d'un repas glucose et (ii) durant une perfusion intraveineuse isoglycémique de glucose puis (iii) l'évaluation de la cinétique plasmatique du peptide co-sécrété afin par d'obtenir la sécrétion d'insuline. Le projet prévoit l'utilisation de 6 porcs miniatures adultes. Une première étape consiste à placer chez ces animaux par voie chirurgicale des cathéters veineux, artériels et digestifs afin de permettre d'une part l'administration de glucose et d'autre part pour assurer les prélèvements de sang artériel. Une seconde étape vise à réaliser les mesures elles-mêmes sur trois journées expérimentales par animal. Le projet est conçu pour appliquer la règle des 3 R. La réduction du nombre d'animaux est obtenue par l'application a priori d'un calcul statistique basé sur des données déjà publiées par notre partenaire étranger. Le remplacement du modèle par un système *in vitro* ou *in silicon* n'est pas envisageable au même titre que la réalisation de l'expérience chez l'animal anesthésié du fait de la participation du système nerveux central dans la régulation de la glycémie. Le critère de raffinement est consubstantiel de la méthode de mesure qui est actuellement considérée internationalement comme le « gold standart ». De plus, la réduction de la douleur instrumentale est réalisée en plaçant de façon chronique en amont de l'expérimentation proprement dite les accès veineux, artériels et digestifs au cours d'une intervention chirurgicale. La douleur au cours et dans les jours qui suivent cette dernière est en permanence suivi à l'aide de grille subjective et objective pour moduler l'administration des substances antidouleur. Ce projet fait l'objet d'un travail collaboratif entre la France et l'Allemagne.

13745 Des ateliers technologiques sont réalisés dans le cadre de l'unité d'enseignement « biotechnologies et méthodologies appliquées à la physiologie » du Master « Biologie et Santé », 1ère année. L'objectif est de permettre aux étudiants de comprendre et de maîtriser un certain nombre de techniques expérimentales (génomiques, protéomiques, électrophysiologiques, explorations comportementales, métaboliques et fonctionnelles) en vue de la poursuite de leur master recherche

puis de leur doctorat. L'atelier spécifique que nous proposons est centré sur l'étude du métabolisme énergétique chez l'animal et s'adresse tout particulièrement aux étudiants qui souhaitent orienter leur recherche sur les maladies métaboliques et nutritionnelles. L'atelier se déroule en 25h, et se décompose en deux parties : une partie théorique de 5h où sont présentés le thème scientifique, les différentes techniques d'exploration fonctionnelle. Les étudiants seront également sensibilisés aux bonnes pratiques de laboratoire et à la législation qui régit l'expérimentation animale au niveau européen (directive UE10/63 ; article 14 pour la prise en charge de la douleur et l'euthanasie des animaux et article 23 sur la compétence des personnels) et au niveau français (autorisation à l'expérimentation par un comité d'éthique depuis 2013). L'approche expérimentale est menée dans le respect de la règle des 3R et des procédures expérimentales visant à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des animaux. La partie pratique de 20h est dédiée à l'exploration fonctionnelle et aux dosages biologiques. Cet atelier permet aux étudiants 1) d'explorer *in vivo* les mécanismes de régulation du métabolisme glucidique par les tests de tolérance au glucose et de tolérance à l'insuline 2) d'évaluer le profil lipidique plasmatique par dosage des triglycérides, 3) de mettre en évidence le rôle du foie dans le stockage des lipides par quantification du contenu en triglycérides et 4) de mesurer la prise alimentaire et l'activité locomotrice spontanée à l'aide du système PHYSIOLOGE. Les étudiants appréhendent ainsi des modèles d'étude *in vivo* en procédant, sur l'animal non anesthésié et non contraint, aux techniques d'exploration fonctionnelle. Les paramètres biologiques seront déterminés par des techniques biochimiques classiques. Les résultats seront analysés et interprétés à partir des données théoriques et comparés à celles de la littérature. Les techniques d'exploration sont très spécialisées et demandent à être réalisées chez l'animal. Elles répondent à une démarche pédagogique progressive (i. e régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique dans les conditions de suralimentation et/ou d'obésité).

Cet atelier sera ouvert par session de 12 étudiants maximum. Les étudiants seront répartis en 3 groupes de 4 et réaliseront les différents protocoles expérimentaux sous la tutelle de 3 personnes habilitées (2 enseignants et 1 technicien), ce qui correspond à un taux d'encadrement de 3 à 4 étudiants par personnel formé. L'enseignant, assisté du technicien sera chargé de la mise en place des procédures permettant le raffinement (analgésie, surveillance de l'état d'endormissement des animaux). Il réalisera l'anesthésie et de l'euthanasie des animaux en fin de procédure pour les prélèvements hépatiques.

Les animaux utilisés pour cet atelier sont des rats mâles de réforme. Le nombre d'animaux utilisé chaque année par session de 12 étudiants est de 18 rats (9 rats pour le groupe contrôlé et 9 rats pour le groupe expérimental) afin de satisfaire aux études statistiques qui seront menées ensuite. Nous pouvons avoir au maximum 24 étudiants par an donc 36 rats au maximum par an. La demande d'autorisation porte sur 5 années, ce qui fait un total maximal de 180 rats. Ce nombre sera revu à la baisse si le nombre d'étudiants n'est pas celui escompté mais sera toujours un multiple de 18 rats/groupe d'étudiant.

13746 Les substances perfluoroalkylées (PFAS) constituent un sous-ensemble de la grande famille des composés perfluorés fabriqués depuis plus de 60 ans. En raison de leurs propriétés physico-chimiques uniques, les PFAS ont été abondamment utilisés pour de nombreuses applications industrielles et des produits de consommation courante. Du fait de leur rémanence chez l'Homme, l'évaluation des risques pour la santé de ces composés revêt une importance primordiale. Le PFOA, l'un des représentants majeurs des PFAS, se caractérise par un large éventail d'effets indésirables à la fois chez l'Homme et chez l'animal, en particulier l'hépatotoxicité, la génotoxicité, l'immunotoxicité et la neurotoxicité. Bien que la restriction de l'utilisation de PFOA soit actuellement en discussion au sein de l'Union européenne, ce composé pose encore, du fait de sa forte persistance, un problème majeur de santé publique. La contribution probable du précurseur du PFOA, le FTOH 8:2, mérite également une attention soutenue. Le tractus gastro-intestinal est la première barrière physique et biologique contre le PFOA et le 8:2 FTOH après exposition orale, et en même temps leur première cible. De manière surprenante, leurs effets sur la paroi intestinale restent, à ce jour, largement méconnus. Par ailleurs, dans nos sociétés occidentales, l'Homme contemporain est confronté, de manière croissante et récurrente, au stress psychologique

chronique, un composant de l'exposome rarement pris en compte dans les études toxicologiques alors qu'il exerce un impact négatif sur la fonction barrière de l'intestin. Le projet de recherche vise à une meilleure compréhension du devenir après ingestion de PFOA et de 8:2 FTOH et de leurs perturbations sur la sphère digestive, sur un système naïf puis « sensibilisé », en ciblant des conditions de barrière intestinale fragilisée sous stress, pour révéler une potentialisation/synergie d'effet(s) toxicologiques. La barrière de l'intestin sera appréhendée sous l'angle du triptyque épithélium/mucus/microbiote, aux interrelations largement méconnues et ce, d'autant plus sous perturbation chimique. Les conséquences sur l'axe intestin/foie seront également évaluées. Dans ce contexte, seule une approche faisant appel à un modèle animal nous permettra d'explorer la complexité des interactions entre PFOA ou son précurseur avec les différents acteurs d'une barrière intestinale fragilisée ou non par un stress chronique et les conséquences/interrelations avec la fonction hépatique. Le PFOA ou son précurseur sera administré par voie orale sur une durée de 28 jours à un animal ayant subi ou non un stress chronique, ici le stress d'évitement passif de l'eau. Des concentrations représentatives d'une exposition forte, moyenne ou faible chez l'Homme seront testées. L'impact sur la fonction barrière de l'intestin sera exploré en évaluant le statut inflammatoire de la muqueuse intestinale, la perméabilité intestinale, l'intégrité du mucus intestinal et en déterminant la composition du microbiote (flore intestinale). Des outils d'imagerie novateurs et performants (comme l'instrumentation NanoSIMS) permettront de localiser ces contaminants dans les organes cibles. L'analyse de la fonction barrière intestinale nécessite l'euthanasie des animaux à la fin des traitements de 28 jours. Durant l'expérimentation, dans le respect de la règle des 3R, toutes les dispositions seront prises afin de minimiser l'inconfort ou la souffrance de l'animal (prélèvements de sang réalisés sous anesthésie par exemple). Pour obtenir des résultats avec une puissance statistique suffisante, ce projet nécessite 636 souris mâles C57BL/6 hébergées collectivement avec enrichissement (maisonnette et bâtonnet de bois) dans des conditions optimales (contrôle des températures et du cycle jour/nuit), avec suivi quotidien de leur bien-être et prise en charge en cas d'inconfort en sortant les animaux de la procédure

13747 Le diabète est une pathologie chronique majeure, grave, invalidante et en expansion liée à une hyperglycémie chronique. Cette hyperglycémie a pour origine soit une absence de sécrétion de l'insuline, dans le diabète de type 1, soit un défaut de sécrétion de cette hormone associée à une insulino-résistance dans le type 2. Elle est sécrétée par des micro-organes, les îlots pancréatiques, et plus précisément par les cellules bêta qui représentent 55-70% des cellules d'îlots. La régulation fine de cette sécrétion est nécessaire au maintien de l'homéostasie glucidique.

Les cellules β des îlots pancréatiques sécrètent la seule hormone capable de diminuer les taux sanguins de sucres (glycémie) : l'insuline. L'hyperglycémie prolongée due à leur destruction/dysfonctionnement cause les diabètes sucrés.

C'est une maladie incurable touchant 415 millions de personnes dans le monde et qui est en expansion, avec 642 millions de cas attendus pour 2040.

Mais traiter les cellules β ne suffit pas : les cellules α , également contenues dans les îlots pancréatiques (microorganes pancréatiques), jouent aussi un rôle. L'hormone glucagon qu'elles sécrètent augmente la glycémie, ce qui aide à combattre les hypoglycémies. Cependant chez les diabétiques cette hormone est en excès participant ainsi à la dérégulation du contrôle glycémique observée chez les sujets diabétiques en favorisant les hyperglycémies.

La régulation de la glycémie repose donc sur l'action de l'insuline et la contre-régulation médiée par le glucagon. Des travaux récents suggèrent que les cellules α influencent les cellules β de manière paracrine et sont essentielles pour une sécrétion optimale d'insuline.

Grâce à des souris transgéniques chez qui on peut supprimer les cellules α après injection d'une toxine, nous pourrions décrire plus précisément l'influence de la présence des cellules α sur l'activité des cellules β et identifier les facteurs libérés par les cellules α qui sont impliqués.

Pour ce projet, 70 souris maximum seront donc utilisées pour permettre un traitement statistique significatif des données obtenues en se laissant une marge de manoeuvre en cas d'échecs. Ces animaux seront produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale

et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et à la règle des 3R. Pour le raffinement, leur habitat est enrichi par ajout de dômes et carré de ouate pour la nidification dans toutes les cages.

Sur ces 70 animaux, 58 seront utilisées directement pour prélèvements ex-vivo des ilots pancréatiques pour différents usages expérimentaux en réponse au glucose ou prélèvement d'organes.

Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, un lot de 12 animaux sera réutilisé pour 2 procédures. Ces procédures ne peuvent être faites que sur l'animal entier car la régulation de la glycémie est liée à toute une série de réponses biologiques non reproductibles intégralement in-vitro car aucune lignée cellulaire ne permet de reproduire le rôle des ilots pancréatiques, nous ne pouvons donc pas remplacer l'utilisation de animaux. Le lot de 12 animaux qui subira la procédure de tolérance au glucose sera suivie après la procédure et traité par analgésique si des signes de douleurs sont observés.

13748 Les cancers urologiques (rein, vessie, prostate) représentent par an dans le monde 13% des cancers (2 200 000 cas), et 7% des décès liés au cancer (700 000 décès) et sont en progression constante. Aux stades avancés, ils sont réfractaires aux thérapies actuelles. De nouvelles options thérapeutiques doivent donc être développées. Les tumeurs urologiques se caractérisent par une grande hétérogénéité intra- et inter-individu. Or, jusqu'à présent, les modèles d'étude préclinique se basent sur les lignées cancéreuses qui ne reflètent pas cette hétérogénéité. Ainsi, malgré le développement de cultures 3D dont la mise en œuvre reste difficile, les modèles animaux s'avèrent toujours indispensables. L'approche par xénogreffe chez la souris immunodéficiente de tumeurs humaines obtenues à partir de patients lors de la chirurgie, reproduit fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines et apparaît comme le modèle d'étude le plus pertinent mais il reste peu répandu dans la sphère urologique. Les implantations seront réalisées sous anesthésie générale.

Dans ce projet, nous proposons de mettre en place une importante plateforme de xénogreffes tumorales issues de patients pour ces cancers afin de pouvoir proposer ces modèles pour une évaluation fiable de candidats médicaments. Pour cela, nous devons les établir, les caractériser, vérifier leur stabilité à la congélation/décongélation pour ensuite les utiliser pour tester des médicaments de référence. Les tumeurs de patients seront fragmentées et greffées sur 5 souris immuno-déficientes en sous-cutané (primo-implantation). Les tumeurs qui se seront développées seront à leur tour implantées chez des souris immuno-déficientes: c'est ce qu'on appelle un passage. Les modèles seront établis grâce à plusieurs passages successifs en sous-cutané. Un modèle sera considéré établi à partir du passage 3 chez la souris. La capacité des modèles au passage 2 à être congelés puis décongelés et reformer des tumeurs chez la souris (pour former un stock de tissus pour le passage 3 et les suivants) sera testée selon 3 protocoles. Nous ne poursuivrons que le développement des modèles supportant la congélation/décongélation.

La réalisation de ces modèles est techniquement difficile à mettre en œuvre du fait d'un taux de prise de greffe variable, allant de 15-20% (cancer de la prostate) à 30-40 % (cancers du rein et de la vessie) et d'autres facteurs tels que le stade et l'agressivité du cancer.

Pour ce projet la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

-Réduction:

Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés pour les différentes étapes du développement des xénogreffes, en limitant le nombre d'animaux par échantillon prélevé

à 5 pour chaque passage et pour les tests de décongélation, et à 10 par groupe pour les tests d'efficacité anti-tumorale de molécules de référence, nombre minimum pour les analyses statistiques.

Nous recueillons par an les tumeurs d'environ 70 patients pour les 3 cancers (10 pour le cancer du rein, 20 pour le cancer de la vessie, 40 pour celui de la prostate). Ainsi sur les 5 ans nous recueillerons environ 350 tumeurs (50 cancers du rein, 100 cancers de la vessie, 200 cancers de la prostate). Étant limité par la quantité de matériel biologique, le prélèvement initial (issu du patient) sera greffé sur 5 souris. Nous développerons les modèles jusqu'au passage 5, avec 5 souris par

passage et par modèle. Par ailleurs, en tenant compte du taux moyen de prise de greffe, nous devrions être en mesure de développer environ 100 modèles (20, 40, 40 respectivement pour les cancers du rein, de la vessie et de la prostate). Pour l'établissement des modèles 4250 souris seront donc nécessaires pour les 5 ans de ce projet. Pour les tests de congélation/décongélation, pour les 100 modèles qui seront développés, 1800 souris seront nécessaires. Pour les tests avec les molécules de référence (3 pour le cancer du rein, 2 pour le cancer de la vessie, et 1 pour le cancer de la prostate) 3600 souris seront nécessaires, soit un total d'environ 9650 souris.

-Raffinement:

Le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux (des bâtons à ronger pour limiter les querelles ; des carrés de coton pour une nidification ; des igloos, permettant le jeu et le repos). Les souris seront nourries et hébergées en groupe ; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif avec induction de plaies. Nous diminuerons la douleur et l'angoisse liées à la xénogreffe en opérant sous anesthésie et en appliquant une analgésie locale au réveil, phase pendant laquelle les animaux seront surveillés. Il est à noter que le développement tumoral n'est pas douloureux pour les animaux. De plus, nous avons établi des points limite qui mettront fin à l'expérimentation en cas de souffrance et d'inconfort des animaux

-Remplacement :

La réalisation d'études précliniques fiables nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines : grande variabilité cytogénétique entre les individus et hétérogénéité au sein même de la tumeur. La validation préclinique d'un nouveau traitement passe donc par l'utilisation d'un large panel de modèles porteurs de tumeurs aux caractéristiques moléculaires variables. Or jusqu'à présent, les modèles d'étude se basent sur les lignées cancéreuses clonales qui ne reflètent pas l'hétérogénéité de la tumeur in situ. Le développement de systèmes de culture 3D est en cours de développement et reste donc difficile à mettre en place. Par conséquent, aucune méthode de remplacement n'existe à ce jour.

13749 De nombreuses molécules sont développées à des fins thérapeutiques, mais l'accès de ces molécules au cerveau et à leurs cibles au sein du tissu cérébral est encore très restreint. Cela pose des contraintes fortes pour le développement de traitements efficaces pour les maladies du cerveau. Notre projet vise à développer une méthode d'encapsulation qui permet la libération contrôlée dans le temps, l'espace et avec des concentrations précises de molécules. Pour cela, des microparticules ont été développées pour contenir des molécules en quantités contrôlées et pouvoir libérer leur contenu à la demande.

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

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

nous n'avons pas encore suffisamment de données pour utiliser des modèles informatiques. Enfin, notre projet de nouvelle technologie est trop préliminaire pour être effectué chez l'Homme.

Le nombre d'animaux estimés pour cette étude princeps est justifié par les différents temps post-chirurgie à analyser, afin d'avoir une cinétique suffisamment précise du devenir des particules lorsqu'elles sont injectées dans le cerveau. Pour tous les groupes, le nombre d'animaux est limité au strict nécessaire pour garantir la significativité. Les 160 animaux seront divisés en 4 groupes : 2 groupes pour l'imagerie *in vivo* et 2 pour l'imagerie *ex vivo*. Pour chaque type d'imagerie, des injections dans le tissu cérébral seront comparées à des injections dans les ventricules cérébraux (poche de liquide dans le cerveau qui permet la communication entre le cerveau et la circulation sanguine/lymphatique de l'organisme). L'utilisation de l'imagerie *in vivo* dans ce projet est destinée à réduire le nombre d'animaux utilisés, puisqu'un même animal peut être observé à différents temps pour établir une cinétique. La durée du projet étant de 2 ans, cette étude représente l'utilisation de 80 animaux/an.

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

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

13750 Les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation, et ont l'obligation de les classer (réglementations REACH et CLP). Si des essais expérimentaux s'avèrent nécessaires pour caractériser les dangers, les tests à utiliser s'appuient sur les lignes directrices (LD) de l'OCDE.

Cette demande porte sur la réalisation d'études de toxicité subchronique (90 jours) de substances chimiques suivant la LD de l'OCDE n°413 adoptée le 25 juin 2018.

Le projet est envisagé sur une durée de 5 ans avec une prévision d'une étude par an, soit un maximum de 5 études. En considérant le schéma expérimental le plus complet, un maximum de 254 animaux (147 mâles et 107 femelles) sera utilisé par étude, soit 1270 rats adultes (735 mâles et 535 femelles) pour 5 ans.

Ce projet comprend 2 procédures expérimentales.

La procédure 1 correspond à la réalisation d'études préliminaires de détermination des concentrations. Elle consiste en une exposition par inhalation, 6h/jour, 5 jours/semaine, durant 5 à 28 jours (durée à définir selon la nature de la substance testée et les objectifs de l'étude), de rats mâles et femelles, à 3 niveaux de concentration de la substance à tester et un témoin négatif. Des groupes satellites pourront être étudiés pour évaluer la réversibilité des effets. Dans cette procédure, un maximum de 84 animaux (42 mâles et 42 femelles) sera utilisé par étude, soit 420 animaux (210 mâles et 210 femelles) pour 5 ans. En considérant le schéma expérimental le plus complet pour cette procédure, par étude, 40 animaux seront utilisés pour constituer les groupes principaux (5 animaux/sexe/concentration testée), et si nécessaire, 40 animaux pour l'étude des groupes satellites (5 animaux/sexe/concentration testée), et 4 animaux surnuméraires (2 animaux/sexe).

La procédure 2 correspond à la réalisation des études principales. Elle consiste en une exposition par inhalation, 6h/jour, 5 jours/semaine, durant 90 jours (13 semaines), à 3 niveaux de concentration de la substance testée et un témoin négatif. Dans cette procédure, un maximum de 170 animaux

(105 mâles et 65 femelles) sera utilisé par étude, soit 850 animaux (525 mâles et 325 femelles) pour 5 ans. En considérant le schéma expérimental le plus complet pour cette procédure, par étude, 80 animaux seront utilisés pour l'étude des groupes principaux (10 animaux/sexe/concentration testée), et si nécessaire, 80 animaux pour l'étude des groupes satellites (5 animaux/modalité testée), et 10 animaux surnuméraires (5 animaux/sexe).

Les schémas expérimentaux les plus complets incluent l'étude de tous les groupes satellites envisageables pour évaluer la réversibilité des effets, la charge pulmonaire, la cinétique de la clairance post-exposition et la persistance ou toxicité retardée de la substance testée. Les animaux de ces groupes seront stabulés durant une à plusieurs semaines après la période d'exposition, jusqu'à leur mise à mort.

Le mode d'exposition, en chambre d'exposition « corps entier » ou « nez-seul », sera défini selon la nature de la substance à tester.

Les animaux seront quotidiennement observés au plan clinique tout au long de l'étude. Ils seront pesés et leur consommation alimentaire et hydrique relevées une fois par semaine. Des analyses de pathologie clinique seront réalisées à partir de prélèvements de sang effectués en cours d'étude et post-mortem. Des examens ophtalmologiques seront également effectués.

Après mise à mort, un examen macroscopique, ainsi que des analyses sur des organes et des échantillons prélevés seront réalisés.

Le tatouage des animaux à l'oreille pour l'identification et les prélèvements de sang effectués à la veine jugulaire seront pratiqués sous anesthésie par inhalation d'isoflurane.

En cours d'étude, un animal présentant une pathologie pouvant être soulagée pourra recevoir un traitement médicamenteux (application locale de vétédine en cas de lésion cutanée, injection(s) intramusculaire(s) de buprénorphine en cas de douleur, ou autre traitement recommandé par le vétérinaire référent).

Les animaux qui seront euthanasiés en fin d'étude et ceux qui auront atteint un point limite nécessitant la mise à mort en cours d'étude recevront une injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital.

Concernant la réduction, le nombre d'animaux qui sera utilisé suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°413.

Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être. Ils seront hébergés par sexe et par concentration à plusieurs par cage pour leur socialisation. Un fond sonore sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif. En cas d'exposition par voie oro-nasale, des tubes seront disposés dans les cages d'hébergement pour permettre aux animaux de se cacher, et se familiariser avec le dispositif d'exposition. Préalablement à l'exposition, tous les animaux seront habitués à la contention imposée par le placement dans les tubes en y étant stabulés au moins 30 min par jour, plusieurs jours consécutifs. Les tubes seront tapissés de matériaux absorbants pour assurer le confort des animaux. Après chaque phase d'habitué, de la nourriture sera déposée dans leurs cages d'hébergement en guise de récompense.

Pour ce qui est du remplacement, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives à l'expérimentation animale qui permettent de répondre au questionnement concernant la toxicité subchronique de l'exposition à des substances par inhalation. Le recours aux études *in vivo* est donc indispensable. Concernant le choix des animaux, le projet suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°413, d'utilisation pour ces études du rat à l'âge jeune adulte et de souches communément utilisées en laboratoire.

13751 Les études des effets pharmacologiques sur le transit intestinal, la vidange gastrique et les sécrétions gastriques visent à caractériser les effets bénéfiques (thérapeutiques) ou indésirables de candidats médicament sur le système gastro-intestinal chez le rat.

Le principe des modèles d'évaluation du transit intestinal et de la vidange gastrique consiste à administrer aux animaux un marqueur (charbon végétal, indicateur coloré ou microbilles solides) par voie orale. Le transit intestinal est évalué par mesure de la progression du marqueur dans les intestins après mise à mort. La vidange gastrique est évaluée soit par pesée du contenu stomacal soit par dosage colorimétrique après mise à mort. Les mesures sont effectuées très rapidement après l'administration du marqueur (15 minutes). Ces deux modèles permettent de rechercher un effet laxatif ou anti-diarrhéique.

Le principe du modèle animal sur les sécrétions gastriques (méthode de Shay) consiste à ligaturer le pylore pour stimuler les sécrétions gastriques. La ligature du pylore est effectuée sous anesthésie générale. 4 heures au maximum après la ligature et mise à mort, le volume, le pH des sécrétions gastriques ainsi que des acidités libres et totales sont mesurés. Ce modèle permet de démontrer un effet pro-sécrétoire ou anti-sécrétoire gastrique et/ou anti-acide.

Ces études sont réalisées au bénéfice des patients incorporés dans les essais cliniques ou post commercialisation pour prévenir d'éventuels effets indésirables et/ou augmenter la probabilité de tester des candidats médicaments efficaces dans les essais cliniques.

Le rat est l'espèce la plus couramment utilisée dans la littérature scientifique pour l'étude de nouveaux candidats médicaments sur la sphère gastro-intestinale.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au fouissement).

- le modèle d'étude de la vidange gastrique requiert une phase chirurgicale de courte durée (10 minutes) réalisée sous anesthésie générale avec suivi clinique post-opératoire pour surveiller les points limites définis dans ce modèle qui se manifestent principalement par une absence de mobilité en réaction à une stimulation de l'animal et/ou une respiration saccadée.

- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.

- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.

Les modèles de transit intestinal et de vidange gastrique sont classés avec un degré de sévérité légère.

Le modèle des sécrétions gastriques est classé avec un degré de sévérité sévère. Les protocoles antalgiques et anti-anxiété sont contre-indiqués en raison du risque d'interférence avec les modèles. Ce risque est susceptible de modifier le profil des effets des candidats médicaments étudiés.

Ces études sont peu fréquentes. Compte tenu du nombre d'études réalisées pendant les années précédentes, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de 500 rats au total.

13752 La fonction de reproduction est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Dans l'hypophyse, des cellules dites gonadotropes secrètent les hormones qui permettent de réguler le fonctionnement des testicules et des ovaires. Le bon fonctionnement de ces cellules est donc essentiel pour assurer la fertilité des individus et des anomalies affectant ces cellules sont connues pour entraîner une stérilité. Ces cellules gonadotropes sont elles-mêmes régulées par une neurohormone sécrétée par l'hypothalamus, la GnRH. La GnRH est sécrétée par l'hypothalamus de façon pulsatile, et la fréquence des pulses varie au cours du cycle sexuel chez la femelle de mammifères (y compris dans l'espèce humaine). De façon surprenante, les cellules gonadotropes ne réagissent pas de la même façon si elles sont stimulées par des fréquences élevée ou faible de GnRH. Cette capacité qu'ont les cellules gonadotropes de décoder la fréquence de la pulsativité de la GnRH est centrale pour réguler la production de stéroïdes sexuels et d'ovocytes par l'ovaire.

Cependant, malgré leur importance, les mécanismes moléculaires à l'origine de ce décodage ne sont actuellement pas connus.

Ces dernières années, de nouvelles approches ont été développées afin d'étudier les mécanismes de régulation des gènes, dénommés mécanismes épigénétiques. Nous souhaitons étudier les mécanismes épigénétiques qui sont à l'œuvre dans les cellules gonadotropes au cours du cycle sexuel afin de mieux comprendre comment est décodé la pulsativité de la GnRH et ainsi l'activité cyclique de l'hypophyse. Afin de mener ce projet qui se déroulera sur 3 ans, nous avons besoin d'isoler chez des souris femelles des cellules gonadotropes à différents stades du cycle. Nous utiliserons un modèle souris génétiquement modifié car lui seul permet de réaliser ces analyses. En effet, il n'existe pas de modèle *in vitro* de bonne qualité susceptible de s'y substituer. De plus, les modèles d'invertébrés ne possèdent pas d'hypophyse et eux aussi inutilisables.

Cette étude s'effectuera sur trois ans. Le modèle génétique que nous emploierons a déjà été utilisé dans d'autres études et les modifications génétiques qu'il porte n'ont pas de conséquence sur la santé des animaux. Ce projet respectera la règle éthique de 3 R : Pour procéder à nos expériences, et en nous limitant à un panel statistiquement représentatif, nous aurons besoin de 275 souris. Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé. Notamment, nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance en appliquant les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

13753 Projet : La richesse en protéines et lipides des produits carnés, si consommé en modération et tenant compte des recommandations nutritionnelles, n'est pas un risque majeur dans le développement des cancers. Ce sont plutôt les composés néoformés à la cuisson des produits carnés, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les amines aromatiques hétérocycliques (AAH), qui présentent un risque majeur dans la survenue des cancers, en particulier le cancer colique. Les données récentes montrent que 4 HAPs sont majoritairement représentés dans des proportions équivalentes : le benzo[a]pyrène, le benzo[a]anthracène, le chrysène et benzo[b]fluoranthène.

Dans ce contexte notre projet vise à étudier les effets de l'association des fibres alimentaires et des produits néoformés après traitement thermique de la viande sur l'initiation et la progression des cancers du côlon. Nous envisageons de réaliser d'une part une étude *in vitro* via des modèles de lignées cellulaires colorectales exposées à différentes doses de composés néoformés en association ou non avec des fibres alimentaires et d'autre part *in vivo* sur des modèles murins conventionnels et transgéniques développant un cancer colorectal spontané.

Type d'animaux : Souris commerciale immunocompétente (BALB/cByJ).

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 596 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la

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

13754 La candidose systémique est une infection mycosique opportuniste grave (30-40% de mortalité). La levure responsable est *Candida* spp, levure commensale du tractus digestif dont la pathogénicité s'exprime en présence de facteurs de risque liés à l'hôte ou facteurs extrinsèques le plus souvent d'origine iatrogène: antibiothérapie à large spectre, chirurgie du tube digestif, hémopathies malignes, infection à VIH/SIDA, diabétiques, transplantés d'organe, grands brûlés, cathéters veineux.

La candidose vaginale est une infection mycosique particulièrement fréquente et peu grave mais potentiellement récidivante (5 à 10% des femmes en âge de procréer). La forme récidivante altère la qualité de vie des femmes touchées.

Le protocole qui suit a pour objet de développer un modèle expérimental d'infection et de proposer un essai vaccinal.

Dans un premier temps, nous proposons de développer un modèle expérimental d'infection à *Candida* spp chez la souris afin de comprendre les mécanismes immunopathologiques impliqués dans la défense contre cette infection et les facteurs de sensibilité liés à l'hôte. L'infection vaginale (procédure 2) se fera par inoculum vaginal calibré après administration d'œstrogène sous-cutanée (facilitateur d'infection) de manière hebdomadaire. L'infection systémique sera réalisée soit par injection intraveineuse (procédure 3), soit par gavage oral et immunodépression (procédure 4).

Dans un second temps, nous proposons d'évaluer l'immunisation et la protection de plusieurs candidats vaccins (procédure 1) grâce à une nouvelle approche de vaccination développée et maîtrisée au sein de notre équipe de recherche (= la transcytose inverse). Cette vaccination sera réalisée par voie nasale et est peu invasive. Cette vaccination sera suivie d'une infection soit locale soit systémique à *Candida* spp.

La règle des 3R (réduire, remplacer, raffiner) sera respectée tant que possible mais on comprend aisément que ce type de recherche (vaccination expérimentale) ne peut être remplacée. Le nombre total de souris a été fixé à 1080 souris au total. Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats.

Tout au long du protocole (après vaccination et/ou infection de *Candida* spp), chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 5) ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

Nous effectuerons régulièrement des prélèvements sanguins sur les souris. Ces prélèvements seront réalisés (maximum 6 par souris) pour suivre l'immunisation et l'infection de chaque animal. On sera aussi amené à évaluer la colonisation digestive et/ou vaginale à *Candida* sp : pour cela, nous utiliserons 2 indicateurs : l'énumération des *Candida* sp au niveau des fèces ou des sécrétions vaginales et visualisation *in situ* et *in vivo* de *Candida* sp fluorescent grâce à la microscopie confocale (technique non invasive).

13755 Le diabète mal contrôlé entraîne de nombreuses complications chroniques, notamment une néphropathie (atteinte des reins qui serait 9 fois plus élevée chez les diabétiques), et une rétinopathie (maladie de la rétine pouvant conduire à la perte de la vue et première cause de cécité chez les moins de 65 ans en France). L'hyperglycémie, taux élevé de sucre dans le sang, endommagement au cours du temps, la paroi des vaisseaux sanguins qui ne peuvent plus assurer leur

rôle d'apport de nutriment et d'oxygène aux différents organes. Les gros vaisseaux sont altérés dans les complications cardiovasculaires, mais aussi les très petits capillaires sanguins dans les maladies touchant les yeux et les reins. L'hypertension, l'obésité sont des facteurs aggravant ces complications.

Nous souhaitons mettre en place chez des rats diabétiques obèses une néphropathie et une hypertension artérielle par uni-néphrectomie afin de déterminer si ces animaux ont une rétinopathie et pourront potentiellement permettre de montrer l'efficacité de traitements contre la maladie au niveau oculaire.

Ce projet nécessitera sur 5 ans au maximum 1515 rats adultes.

Afin de respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux par groupe est limité pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques. Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter la mise à mort l'animal.

- Raffinement : un suivi quotidien des animaux sera effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal. Les examens non invasifs pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou en cabinet vétérinaire. Les examens de l'œil qui requièrent un immobilisme de l'animal pourront être réalisés sous anesthésie pour son confort. Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

-Remplacement : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

13756 L'obésité est un problème majeur de santé publique à forte prévalence dans les pays industrialisés. En France, les dernières données recueillies montrent que 32% des adultes sont en surpoids et que 15% sont obèses. En marge des traitements diététiques et d'accompagnement de première intention et des solutions chirurgicales ultimes telles que la pose d'un anneau gastrique, l'arsenal thérapeutique actuel est d'autant plus réduit que des médicaments sont retirés des officines à cause de leurs effets indésirables délétères. De nouvelles voies de traitement contre l'obésité sont actuellement explorées. Certaines reposent sur le fait que quelques neuropeptides, des composés sécrétés par des cellules du cerveau, jouent un rôle clé dans le contrôle de la prise de nourriture. De fait, l'administration intracérébrale de l'un d'entre eux, le neuropeptide-1, entraîne une forte diminution de la prise de nourriture et contrôle la glycémie. A ce stade, nous souhaitons administrer le neuropeptide-1, sous sa forme naturelle et sans aucun excipient, par instillation nasale dans un organisme vivant et y suivre sa localisation au cours du temps. Ces données sont essentielles et font partie des études pharmacologiques qui sont menées pour savoir si le neuropeptide-1 est un bon candidat comme médicament contre l'obésité et si la voie nasale permettrait son utilisation chez l'homme. Pour ce faire, nous devons avoir recours à des modèles animaux dans la mesure où aucun modèle de substitution ne permettant de mener à bien ces objectifs n'est actuellement disponible. Notre choix s'est tourné vers la souris pour deux raisons majeures : 1/ la majorité des études visant à déterminer les mécanismes mis en jeu dans la régulation de la glycémie ont été réalisées chez cette espèce, et 2/ les souris constituent, par l'obésité qu'elles développent rapidement sous régime hypercalorique, le modèle le plus adapté pour révéler les effets bénéfiques du neuropeptide-1. La molécule administrée sera un dérivé radiomarqué du neuropeptide-1, pour permettre son suivi par imagerie.

Le nombre maximal d'animaux nécessaire à cette étude est estimé à 36 pour que les résultats soient statistiquement analysables. Les souris seront hébergées en cage standard conformément

à la réglementation avec un enrichissement du milieu de vie constitué de nids en copeau de peuplier. Durant toute la durée de l'étude, les souris seront placées sous contrôle permanent pour s'assurer de leur état de santé et de leur bien-être. Les animaux ayant reçu une administration du neuropeptide-1 seront surveillés avec une attention toute particulière pendant la période post-injection jusqu'à leur sacrifice intervenant dans l'heure suivante avec mise en place d'une grille décisionnelle d'arrêt afin de limiter une éventuelle souffrance des animaux. A l'issue du protocole les animaux seront euthanasiés en accord avec la réglementation.

13757 Écouter dans des situations réalistes est un processus actif qui mobilise les facultés perceptives et cognitives, conférant au discours du sens, à la musique sa capacité à susciter des émotions et aux sons de l'environnement de la pertinence. Grâce à l'écoute, les humains et les autres animaux naviguent à travers des scènes acoustiques complexes, séparent des sources sonores mélangées, désambigüisent des messages et évaluent leur pertinence comportementale. Ces prouesses remarquables sont actuellement au-delà de notre compréhension et dépassent de loin les capacités des systèmes d'ingénierie audio les plus sophistiqués. L'objectif du projet de recherche est d'étudier expérimentalement une approche radicalement nouvelle de l'audition, où l'écoute active émerge d'une profonde interaction entre les processus sensoriels adaptatifs et la cognition décisionnelle. Notre objectif est d'intégrer la fonction cognitive comme faisant partie intégrante du traitement sensoriel, ce qui se prête à une investigation neurophysiologique. Plus précisément, nous allons explorer le postulat que la perception active est médiée par un processus d'adaptation rapide au niveau neuronal (ici appelé plasticité rapide). À la confluence du traitement sensoriel et cognitif, la plasticité rapide se retrouve à tous les niveaux du système auditif, de la cochlée jusqu'au cortex auditif et préfrontal.

Le projet s'appuie sur les travaux réalisés en physiologie et en modélisation informatique de ces phénomènes par les chercheurs en charge du protocole lors de la dernière décennie. Ces efforts ont abouti à la découverte de plasticité rapide dans le cortex auditif, au niveau du neurone unique et de populations de neurones. Ils ont aussi conduit à l'élaboration d'un modèle neuromimétique de traitement auditif qui ont mené à des percées technologiques et à des applications concrètes. Ils ont enfin permis d'utiliser une technologie de neuroimagerie large-champ chez le furet. Ce projet étendra ces recherches et intégrera de nouveaux paradigmes psychophysiques puissants pour sonder l'écoute active chez l'homme. S'appuyant sur ces domaines très complémentaires et plusieurs innovations techniques (reconstruction de stimulus à partir d'enregistrements de neurones à grande échelle chez les animaux réalisant une tâche de comportement), nous espérons promouvoir une vision nouvelle de la perception auditive et de la cognition. Cela contribuera également de manière significative à des avancées significatives dans le domaine du traitement du signal pour les prothèses auditives cliniques, étant donné que de nombreuses limitations actuelles ne sont pas technologiques, mais plutôt conceptuelles. Le projet répond à trois objectifs spécifiques à travers des projets expérimentaux qui intègrent de nombreuses méthodologies, principalement la psychoacoustique, la physiologie du comportement couplée à des enregistrements neuraux électrophysiologiques et en imagerie fonctionnelle UltraSon, des modèles informatiques et leurs applications : (1) explorer les effets de contexte sur le codage populationnel des sons dans le cortex auditif et frontal, ainsi que appréhender (2) les bases physiologiques de la plasticité neuronale liée à l'attention dans les cortex auditif et frontal, et (3) le codage des sons naturels et de leur localisation spatiale dans le cortex auditif. Afin de mieux comprendre les circuits neuronaux qui sous-tendent ces mécanismes physiologiques, nous réaliserons en parallèle des analyses histologiques sur un sous-ensemble des animaux. Toutes ces expériences doivent tirer parti au maximum de notre capacité à réaliser des enregistrements dans des animaux réalisant une tâche de comportement, durant laquelle les fonctions cognitives sont actives et exprimées dans les réponses neurales dans le cerveau.

Les mêmes questions de recherche seront testées et approfondies dans l'étude de la perception visuelle. Nous réaliserons des expériences identiques en substituant des stimuli visuels aux stimuli auditifs. Nous testerons ainsi si les découvertes réalisées dans le domaine auditif peuvent être

appliquées dans le domaine visuel. Nous étudierons aussi les interactions entre ces deux modalités sensorielles durant l'intégration d'indices sensoriels lors de la prise de décision.

Tirant parti de notre expertise et de notre connaissance du modèle furet, nous avons mis un grand soin dans le respect des principes suivants :

+ Réduction : Au total, nous avons prévu d'utiliser 90 furets. Certains animaux seront aussi utilisés dans le cadre d'études d'anatomie en parallèle, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Il est fréquent qu'un même animal soit entraîné sur plusieurs tâches comportementales, ce qui réduit aussi le nombre d'animaux considérés.

+ Raffinement : Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies en jouets et tunnels divers. Ils sont régulièrement mis tous ensemble dans une aire de jeu. Durant les week-ends, les animaux ne doivent pas effectuer la tâche comportementale. Leur état de santé est suivi en permanence en collaboration avec un vétérinaire. Enfin, environ la moitié des animaux sont replacés avec une association partenaire. Ceci est possible quand l'expérimentation ne nécessite pas de traitement histologique post-mortem du cerveau.

+ Remplacement : Les furets constituent un animal modèle nécessaire à l'étude de la perception auditive durant une tâche comportementale. En effet, ils sont capables d'apprendre des tâches complexes, de percevoir des sons dans une gamme auditive similaire à celle de l'homme, et de supporter un implant multi-électrode avec 200 électrodes. Leur cerveau à cortex plissé permet aussi d'étudier le rôle fonctionnel des plis corticaux, ce qui n'est pas possible chez le rongeur à cortex lissencéphale.

13758 Le syndrome métabolique, caractérisé par une obésité et un diabète de type 2, constitue un problème majeur de santé publique. Lié à la consommation d'aliments riches en graisses, ce syndrome se caractérise par la perte de sensibilité à l'hormone leptine, essentielle à la modulation de l'appétit. Il n'existe à ce jour aucun traitement pour contrer cette résistance à la leptine. Les endozépinines sont codées par le gène Diazepam Binding Inhibitor (DBI) et agissent sur trois récepteurs différents. Nos résultats antérieurs montrent que l'administration d'endozépinines diminue fortement la consommation alimentaire, selon un mécanisme de sensibilisation à la leptine, passant par la mobilisation de l'un des trois récepteurs des endozépinines. Notre projet vise à caractériser l'impact d'une suppression des endozépinines sur la régulation de la consommation alimentaire, de la glycémie et des dépenses énergétiques, ainsi que sur la susceptibilité de développer une résistance à la leptine sous régime alimentaire enrichi en graisses.

Les questions posées nécessitent deux lignées de souris génétiquement modifiées : 1) des souris chez qui le gène DBI, codant pour les endozépinines, a été invalidé ; 2) des souris chez qui une mutation a été introduite dans le gène DBI pour empêcher sélectivement l'action des endozépinines sur le récepteur responsable de leur modulation de l'appétit. Pour chacune de ces deux lignées, des souris contrôles non génétiquement modifiées issues des mêmes portées, seront incluses dans l'analyse. Ces souris seront réparties en deux groupes selon leur régime alimentaire (standard ou enrichi en graisses).

Dans le cadre des 3R, l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution *in vitro* n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'implication des endozépinines dans le contrôle de la consommation alimentaire et du poids corporel. Notre expertise nous permet de définir au plus juste le nombre d'animaux nécessaires aux mesures post-mortem terminales après 15 semaines de régime alimentaire. Pour la moitié de la cohorte, les animaux seront également utilisés pour des procédures peu invasives, dont une procédure raffinée d'analyse multiparamétrique de la consommation alimentaire et des dépenses énergétiques. Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse liée au placement en cages individuelles de cette moitié de la cohorte sur les trois dernières semaines de régime alimentaire, les animaux seront placés en cages transparentes disposées côte à côte de sorte à permettre les contacts visuels et olfactifs entre congénères. Comme lors de l'hébergement en cages collectives, le milieu sera enrichi. Par ailleurs, l'évaluation de la souffrance sera basée sur l'établissement d'un score de souffrance, lors des mesures bihebdomadaires du poids corporel tout au long de l'étude,

et quotidiennement lors des procédures expérimentales, de sorte à administrer un traitement antalgique (Buprénorphine), ou sortir un animal de l'étude si nécessaire. Compte tenu du caractère non dommageable de l'inactivation totale du gène DBI, la mutation introduite pour invalider sélectivement l'action des endozépinines sur l'un de leurs 3 récepteurs devrait également s'avérer non dommageable. Notre suivi continu de l'ensemble des animaux nous permettra de nous assurer du caractère non dommageable des modifications génétiques employées et de limiter l'inconfort des procédures expérimentales.

Compte tenu du nombre de groupes expérimentaux et d'un effectif de 8 animaux par groupe, 256 souris mâles de génotypes appropriés seront nécessaires à cette étude. L'élevage des deux lignées nécessitera par ailleurs 204 animaux reproducteurs et aboutira à la production d'environ 788 souriceaux de sexe et/ou génotype non exploitables. Au total 1228 animaux seront donc utilisés.

13759 Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles proviennent des mégacaryocytes de la moelle osseuse et adoptent dans la circulation une morphologie caractéristique en forme de disque, dont le maintien dépend d'un anneau de microtubules appelé bande marginale. Les microtubules sont constitués de nombreuses protéines appelées tubulines, qui sont toutes décorées d'une série de modifications post-traductionnelles. Les modifications post-traductionnelles sont des modifications protéiques catalysées par un large éventail d'enzymes. Dans le cas des tubulines, elles sont capables de modifier les propriétés physiques et biochimiques des microtubules, et nous pensons donc que celles-ci ont un rôle important à jouer dans la formation et le maintien de la bande marginale. Notre projet vise à étudier leur rôle dans la lignée plaquettaire à l'aide d'une série de souris déficientes pour les enzymes impliquées dans leur régulation. Il permettra, à terme d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients présentant des maladies plaquettaires.

Les expériences consisteront à réaliser

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

Réduction. Une même souris sera utilisée pour plusieurs types d'expérience et comme nous maîtrisons l'ensemble des techniques mises en œuvre dans ce projet, aucune mise au point préalable n'est nécessaire. Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est calculé au plus près afin de permettre une analyse statistique des données.

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

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

Un total de 416 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

13760 Les développements récents de l'immunothérapie basée sur la modification des cellules du patient (CAR-T cells) sont en train de révolutionner la prise en charge et le traitement des cancers du sang. Il s'agit de modifier *ex vivo* les cellules immunitaires du patient pour qu'elles expriment un récepteur synthétique (le CAR) dirigé contre l'antigène CD19, leur permettant alors de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses exprimant cet antigène tumoral à leur surface. Cependant, le coût élevé

de ces traitements qui sont patient-spécifiques, la complexité technique de leur mise en œuvre, les effets secondaires observés mais surtout l'efficacité encore limitée dans le temps entraînent un accès restreint à ces nouvelles thérapies.

Notre innovation repose sur un lentivecteur codant pour le CAR CD19 encapsulé dans des polymères chargés positivement et négativement pour former des nanoparticules biodégradables autour du lentivecteur, peu immunogènes, non toxiques et à fort pouvoir de transfection. Cette formulation permet de stabiliser le vecteur lentiviral durant son temps de résidence dans la circulation sanguine et de le protéger des attaques d'anticorps neutralisants générés par le patient et qui impactent l'efficacité de transduction. Grâce à cette technologie de CARs *in vivo*, il n'est donc plus nécessaire de reprogrammer les lymphocytes T *ex vivo*, une simple injection suffit, le patient devenant son propre incubateur de cellules T. Les étapes lourdes et complexes de sélection des lymphocytes du patient, leur activation et leur amplification deviennent inutiles ce qui réduit drastiquement le coût du traitement, généralise sa mise en œuvre dans les centres de soins et finalement le rend accessible à tous les patients. Ce protocole d'administration par simple injection intraveineuse permet également plusieurs cycles de traitement (ce qui n'est pas le cas avec la technologie actuelle) et donc potentiellement une meilleure efficacité sur le long terme.

Dans nos modèles cellulaires nous avons mis au point les conditions de formulation de notre produit permettant de transduire de manière robuste et reproductible (45 % de cellules modifiées) les cellules immunitaires murines et humaines avec différents transgènes (GFP, luciférase, mCherry, CAR-CD19). Nous avons également démontré qu'il était possible de modifier spécifiquement ces cellules pour qu'elles expriment en surface le CAR anti-CD19. Nous avons pu démontrer dans des tests de cytotoxicité que les lymphocytes modifiés avec ce CAR-CD19 sont capables d'éliminer des cellules cancéreuses exprimant l'antigène tumoral CD19 tout en restant inactives sur des cellules CD19-négatives.

Ce projet d'expérimentation animale constitue la première étape du développement préclinique de notre CAR *in vivo* ciblant le marqueur tumoral CD19 que nous souhaitons mener jusqu'à la démonstration de sa sécurité et de son efficacité thérapeutique dans des modèles murins de cancers hématologiques. Ces résultats sont un prérequis avant de lancer un essai clinique de phase I/II en 2022. Mais avant d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de notre produit dans des modèles murins de cancers hématologique, nous devons démontrer chez l'animal que la modification des cellules cibles est toujours efficace lorsque notre produit est injecté et distribué entre les différents compartiments de l'organisme et que notre CAR *in vivo* est bien toléré. Ces problématiques ne peuvent être abordées que via l'expérimentation animale. Aussi nous explorerons la biodistribution et la sécurité de notre produit sur des souris immunocompétentes afin de mimer le plus possible les conditions physiopathologiques humaines. Le choix de la souris est justifié car c'est un modèle de référence en oncologie, avec des souches dont le système immunitaire a été très largement caractérisé et dont la prédictibilité a été démontrée dans de nombreuses études en immunothérapie.

Ainsi, nous nous proposons d'injecter les lentivecteurs (où le CAR CD19 est remplacé par un gène rapporteur visualisé par imagerie) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire à des doses croissantes et de suivre leur devenir chez la souris par imagerie. Un marquage spécifique du transgène délivré par le lentivecteur permet de suivre notre produit au cours du temps, ce qui réduit de manière importante le nombre d'animaux puisque le produit sera suivi sur 14 jours pour une même souris. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés et les principaux organes seront collectés pour analyser quantitativement la répartition du produit par une deuxième méthode complémentaire de l'imagerie (qPCR).

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude approfondie permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Cette étude nécessite 96 animaux au total. Afin de minimiser la consommation inutile des 96 souris qui pourraient être exposées à des doses dépassant la dose maximale tolérée, nous avons prévu 4 procédures qui seront lancées de manière séquentielle après avoir vérifié que les doses et protocoles d'injections de la procédure précédente ne présentent pas de toxicité macroscopique particulière.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de

complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations par voie intraveineuse ou perfusion se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués. L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien.

13761 Le diabète est une maladie chronique grave qui se déclare lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline (hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, ou glycémie), ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser correctement l'insuline qu'il produit. À l'échelle mondiale, on estime à 422 millions le nombre des adultes qui vivaient avec le diabète en 2014, contre 108 millions en 1980. La prévalence mondiale du diabète (normalisée selon l'âge) a presque doublé depuis 1980, passant de 4,7 à 8,5 % de la population adulte. Cette prévalence inquiétante s'accompagne en outre d'une mortalité importante: ainsi, en 2012, on attribuait directement au diabète environ 1,5 million de décès au niveau mondial. La prise en charge du diabète nécessite un traitement journalier chronique et sa parfaite observance est nécessaire afin de limiter les complications, nombreuses, de cette pathologie. Or de nombreuses études indiquent que l'observance d'un traitement est étroitement liée à la fréquence des traitements. Le développement de traitements antidiabétiques à effets prolongés, de façon à réduire la fréquence de leur administration, est ainsi actuellement en plein essor.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel pharmaceutique qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Cet industriel a notamment développé une nouvelle forme de galénique (matrice sous-cutanée) permettant une libération lente et prolongée de médicaments. Le médicament Z est un antidiabétique de première intention ayant reçu une autorisation de mise sur le marché et dont l'efficacité en tant qu'antihyperglycémiant à largement été documentée. En théorie, la galénique de notre client devrait largement améliorer la biodisponibilité du médicament Z sur le long terme tout en diminuant l'amplitude de ses effets secondaires en évitant les effets de pics plasmatiques. Elle aurait ainsi l'avantage de permettre une réduction drastique des prises pour le patient (une administration par mois) améliorant ainsi largement son confort de vie. La matrice à libération prolongée de notre client a été testée *in silico* et *in vitro* et sa bonne tolérance locale au niveau sous-cutané a également été démontrée. Au total, 7 formulations à libération prolongée du médicament Z différentes ont été développées et l'objectif du présent projet vise ainsi à déterminer leur profils pharmacocinétiques *in vivo*, suite à une administration unique par voie sous-cutanée chez le rat. Ces profils seront comparés à ceux obtenus lors d'administrations uniques et répétées du médicament Z selon sa posologie classique (une administration orale par jour), ou selon des administrations sous-cutanées (permettant une comparaison directe avec la même voie d'administration que la formulation à libération prolongée) ou intraveineuses (permettant une mesure de la biodisponibilité des autres voies d'administration vs. IV).

Les procédures du présent projet se limiteront ainsi à l'administration des formulations à libération prolongée du médicament Z et du médicament Z suivies de prélèvements sanguins répétés pour dosages des composés et détermination des profils pharmacocinétiques. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux sécuriser le développement de leurs composés en permettant une sélection et une classification de ses leads sur des critères pharmacocinétiques. Pour cette étude, un total de 78 rats Sprague Dawley mâles sera nécessaires, séparés en 10 groupes expérimentaux. La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole: - Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études pharmacocinétiques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les volumes des prélèvements sanguins en série seront limités au strict nécessaire pour l'élaboration des dosages. Dans le cas des groupes traités par le Médicament Z, les prélèvements s'avérant plus fréquents et rapprochés que pour les autres groupes (1/2 vie du médicament Z courte et diverses modalités d'étude), l'effectif a été doublé afin de ne réaliser que la moitié des prélèvements sur un même animal. Par ailleurs, les prélèvements seront réalisés par ponction de la veine de la queue à l'aide de microperfuseurs à ailettes, ces derniers autorisant un prélèvement sanguin en n'insérant

que le premier millimètre de l'aiguille dans la veine. Un enrichissement du milieu de vie sera assuré par l'ajout de petites briquettes en bois et de tubes cartons spécifiques pour rat (SAFE). Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. - Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure d'obtenir des données significatives sur les paramètres pharmacocinétiques étudiés. - Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude des paramètres pharmacocinétiques.

13762 L'infection au cours de la grossesse par le cytomégalovirus (CMV) représente 1% des naissances et est une cause majeure de pathologie neuro-développementale chez le nouveau-né et le nourrisson (e. g. surmortalité ; malformations cérébrales ; crises d'épilepsie ; paralysie cérébrale ; surdité ; handicap intellectuel ; etc.). L'étude de modèles animaux pertinents reste indispensable pour en comprendre certains des mécanismes, qui sont mal connus, et proposer des stratégies d'intervention en l'absence actuelle de traitements préventif ou curatif efficaces. Il est en effet très difficilement envisageable de mettre en œuvre des stratégies de remplacement pour étudier cette thématique.

Dans le modèle d'infection du cerveau de rat en développement par le CMV que nous avons mis au point, nos études antérieures démontrent l'existence d'altérations précoces de certains acteurs neuro-immuns, et notamment : l'infection par le CMV de rat (RCMV) de cellules immunitaires cérébrales ; une modification précoce de l'état d'activation de certaines cellules immunitaires du cerveau, appelées microglies ; et une dérégulation de certaines molécules d'intérêt appelées chimiokines, d'origine cellulaire ou virale. Au niveau cellulaire, nos travaux indiquent le rôle crucial joué par l'activation des microglies foetales dans l'émergence de phénotypes postnatals récapitulant certains aspects-clés de la pathologie humaine correspondante. Au niveau moléculaire, nos travaux montrent qu'une chimiokine virale, appelée r129, est exprimée très rapidement après l'infection cérébrale, et qu'elle joue un rôle important pour l'infection par le RCMV et pour l'émergence des phénotypes postnatals délétères dans les premières semaines de vie postnatale. Un RCMV porteur d'une version mutée artificiellement de la chimiokine r129, que nous appellerons r129 Δ NT, est capable de bloquer les effets délétères du RCMV porteur de la version normale, dite "sauvage", de r129, lorsque les deux virus (RCMV sauvage et RCMV muté) sont administrés au même moment.

Forts de ces résultats encourageants de co-infections, nous désirons dans le présent projet poser les questions suivantes :

i/ stratégie de prévention : est-il possible de contrer les effets délétères du RCMV sauvage dans le cerveau foetal, en infectant cette fois préalablement le cerveau avec du RCMV codant pour r129 Δ NT ?

ii/ stratégie de traitement : est-il possible de contrer les effets délétères du RCMV sauvage dans le cerveau foetal, en traitant ces cerveaux infectés cette fois ultérieurement avec du RCMV codant pour r129 Δ NT ?

iii/ compréhension des mécanismes : que ce soit pour la co-infection, l'infection préalable, ou l'infection ultérieure, quels sont les mécanismes mis en jeu aux niveaux cellulaires et moléculaires ?

Pour ce faire et comme déjà réalisé auparavant, nous utiliserons dans ce projet la technique d'injection dans les ventricules cérébraux d'embryons de rats, de particules virales recombinantes (RCMV-GFP: forme "sauvage" ; RCMV-r129 Δ NT-GFP: forme mutée) afin d'en suivre le processus infectieux dans le cerveau et les conséquences après la naissance. Des analyses pre-natales et postnatales à différents stades du développement et de la maturation cérébrale seront réalisées à différents niveaux. Pour certaines analyses, nous utiliserons des rats dits "transgéniques" (CX3CR1-Tomato), qui permettront d'identifier par fluorescence les microglies.

Evidemment ces expériences seront réalisées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux et de raffinement (règles des 3R). Dans la mesure du possible, un même animal pourra

être utilisé pour plusieurs expériences physiopathologiques. Par exemple un même cerveau pourra être utilisé pour plusieurs types de marquages immunohistochimiques, et un même animal sera testé pour l'ensemble des phénotypes d'intérêt durant la période d'évaluation postnatale. Une même femelle gestante pourra générer après la mise basse des ratons qui seront utilisés à différents temps de développement postnatal (par exemple, P1, P7 et/ou P15). Ce projet sur quatre ans utilisera au total 890 rates gestantes, 840 embryons, et 3380 ratons.

Les animaux seront hébergés et manipulés en environnement protégé de type A2. Le bien-être des animaux, qu'il s'agisse des rates gestantes comme de leur progéniture, sera évalué quotidiennement ; ainsi, croissance staturo-pondérale, aspect général, et comportement seront observés. En particulier, les points-limites nécessitant une intervention durant la période d'observation phénotypique postnatale (trois premières semaines de vie postnatale) seront définis et précisés en tenant compte des expériences similaires réalisées précédemment. L'environnement des animaux sera bien entendu enrichi, avec des objets souples (pour éviter les blessures des mères après la chirurgie) permettant aux femelles de former des petits nids douillets (mini-rouleaux de papier foisonnant ; litière de carrés de cellulose vierge). Après le sevrage, l'environnement sera enrichi avec des objets en carton (tunnel ou maisonnette) ou en bois (buchette en peuplier).

13763 La myopathie centronucléaire autosomique dominante est une forme rare de myopathie congénitale due à des mutations du gène *DNM2* codant la dynamine 2. Aucun traitement n'est à ce jour disponible et les mécanismes physiopathologiques sont encore largement ignorés. La dynamine 2 est une enzyme impliquée dans les processus de trafic membranaire intracellulaire. Un des objectifs de notre équipe de recherche est de comprendre les mécanismes physiopathologiques de la pathologie et de développer des approches thérapeutiques. Dans ce contexte, un modèle murin exprimant une mutation de la dynamine 2 a été créé par Knock-in en introduisant dans le gène endogène de souris C57BL6 la mutation humaine la plus fréquente changeant l'acide aminé Arginine en position 465 de la protéine par un tryptophane (R465W). Cette lignée de souris KI-Dnm2R465W développe à l'état hétérozygote une faiblesse et une atrophie musculaire progressive dont les premiers signes apparaissent à 1 mois et s'amplifient jusqu'à environ 8 mois avec une perte de force musculaire l'ordre de 40% par rapport à des souris sauvages. Ce phénotype est comparable à celui observé dans la myopathie humaine. Les souris hétérozygotes sont par ailleurs viables et fertiles. Les souris homozygotes meurent dans les premières 24h après la naissance.

L'objectif de ce projet de 5 ans est de maintenir la lignée de souris KI-Dnm2R465W et de générer un nombre de souris hétérozygotes et sauvages nécessaires pour continuer le développement pré-clinique d'une stratégie thérapeutique visant à rétablir le phénotype musculaire des souris hétérozygotes. Nous avons en effet récemment développé une thérapie par ARN interférence allèle spécifique et réalisé la preuve de principe de cette approche avec une restauration complète des anomalies musculaires dans le modèle de souris lorsque le traitement est administré par l'intermédiaire d'un vecteur viral au début des symptômes. Notre objectif est maintenant de poursuivre le développement de cette stratégie thérapeutique et plusieurs questions seront adressées dans les 5 prochaines années nécessitant l'utilisation d'animaux :

- La maintenance sur le long terme de l'efficacité du traitement après une administration dans le muscle et l'efficacité du traitement à un stade intermédiaire de la maladie.
- L'efficacité du traitement après une administration du traitement via le système sanguin.
- La recherche de moyens d'améliorer l'efficacité du traitement chez les souris plus âgées en améliorant l'entrée du virus dans le muscle (par une augmentation de la dose virale administrée, un changement de sérotype d'AAV ou un pré-traitement avec de l'ARN interférence).
- L'étude de l'efficacité d'une administration de la molécule thérapeutique en n'utilisant pas de virus (l'ARN interférence couplé à un transporteur lipidique).
- Le suivi du transport des particules virales dans le muscle malade en utilisant vecteur viral couplé à un fluorophore.

Ces projets sont décrits dans une autre demande intitulée « Thérapie de la myopathie centronucléaire autosomique dominante ».

Ils nécessiteront l'utilisation de 181 souris hétérozygotes présentant un phénotype dommageable et donc le maintien de la lignée KIR-465 qui fait l'objet de cette demande d'autorisation. Le maintien de la lignée nécessitera l'utilisation de 120 souris femelles hétérozygotes présentant un phénotype (et 60 mâles sauvages) destinées aux accouplements afin de générer les 181 souris hétérozygotes nécessaires au projet de thérapie pour les 5 ans du projet. 301 souris KIR-465 hétérozygotes avec phénotype sont donc concernées par la présente demande. Ce projet est mis en place chez la souris car il s'agit d'une étape indispensable au développement pré-clinique de notre molécule. Le choix du modèle murin KI-Dnm2R465W s'impose car il s'agit de l'unique modèle animal de la myopathie centronucléaire dominante disponible à ce jour. De plus la molécule testée ici pour laquelle la preuve de concept a été réalisée est un outil génétique qui cible spécifiquement la mutation du gène portée par ce modèle.

Le calcul du nombre d'animaux nécessaire repose sur nos précédents projets qui ont permis de déterminer le nombre minimum de souris à utiliser afin d'évaluer de façon correcte les paramètres observés (entre 6 à 8 souris par groupes expérimentaux). Les analyses statistiques sur les paramètres mesurés sur ces groupes de petite taille seront réalisées par un test bi-latéral non paramétrique de type Mann-Whitney ou une analyse de variance de type Kruskal-wallis dans les cas où plus de 2 groupes seront comparés.

Nous avons préalablement identifié l'ARNi allèle spécifique efficace dans des cellules en culture et démontré son absence de toxicité sur les cellules. Nous avons par la suite démontré dans un autre projet son innocuité et son efficacité dans le muscle de souris du modèle de la maladie. L'utilisation de vecteurs viraux de type AAV n'entraîne pas de douleurs et donc de mise en place de traitement particulier pour y palier. L'entretien des animaux et les expériences seront réalisés par un personnel titulaire des autorisations et formations nécessaires. Les animaux sont observés quotidiennement par l'animalier en charge de la lignée ou par les personnes en charge des protocoles. Pour tous les projets, des modifications importantes de comportement laissant supposer une douleur excessive (retrait ou vocalisation excessive à la manipulation, prostration ou agitation anormale) seront considérées comme critères d'arrêt et conduira à l'euthanasie des animaux concernés par dislocation cervicale.

13764 La prise en compte du bien-être animal nécessite la sensibilisation, la formation et l'acquisition des compétences pour le personnel concevant ou appliquant des procédures expérimentales. L'acquisition de ces compétences est un prérequis et leur mise à jour et leur suivi en fonction des besoins des projets scientifiques est obligatoire. Nous souhaitons mettre en place une formation d'initiation à la chirurgie expérimentale qui est une formation réglementaire soumise à un agrément par le Ministère de l'Agriculture. Elle est obligatoire pour les personnes concevant des projets comprenant des procédures chirurgicales ou réalisant ces procédures. Le but de cette formation est d'acquérir des notions élémentaires et des gestes et attitudes de base nécessaires à l'expérimentateur pour réaliser une procédure définie avec une prise en charge satisfaisante de l'anesthésie, de l'analgésie et du bien-être animal.

Chaque session de formation sera clôturée par une discussion, une évaluation et une validation d'acquis. Elle comprend un enseignement théorique de 9h et un enseignement pratique de 14h30. Elle permet tout d'abord de mettre en évidence les contraintes liées au choix du matériel et à l'organisation de la table opératoire puis de faire acquérir au manipulateur les compétences pour intervenir sur l'animal dans les étapes pré, per et post-opératoires. Les ateliers proposés dans cette formation sont l'anesthésie, l'analgésie, les biopsies, les points de suture et une expérience chirurgicale simple. Ces différents ateliers permettent d'illustrer la difficulté de la conception d'une procédure chirurgicale. Ils prennent en compte le choix du matériel, la gestion des différentes étapes chirurgicales et la prise en charge du suivi post-opératoire.

Une partie de cette formation sera réalisée sur de la matière inerte (blanc de poulet) en substitution de souris vivantes. Lors des procédures, une analgésie adéquate sera pratiquée et un suivi clinique sera réalisé avec une mise en place de points limites précis (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer) qui permettront d'éviter toute souffrance des souris. Toutes les souris utilisées sont suivies afin d'évaluer leur comportement et par conséquent leur bien-être. Pour enrichir le

milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton et des maisonnettes. Ces cages seront ventilées individuellement avec un contrôle et un suivi des paramètres environnementaux.

Les souris utilisées sont issues d'élevage ne disposant pas des gènes d'intérêt pour les projets de recherche et que celles-ci n'ont pas été préalablement impliquées dans d'autre procédure expérimentale. Chaque session de formation de dix stagiaires nécessite l'utilisation de vingt souris. Comme nous envisageons de réaliser une session par an, le besoin en animaux sur cinq ans est de 100 souris au total.

13765 L'objectif des protocoles d'immunisations rat est la production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux, qui sont utilisés à des fins scientifiques et médicales. Les applications pour l'utilisation des anticorps peuvent être diverses comme par exemple :

- Fabrication de tests de diagnostic permettant la détection de maladies en médecine humaine
- Préparation de médicaments pour usage en médecine humaine (médicaments biologiques)
- Applications diverses en recherche et développement

La production d'anticorps sur rat est réalisée par administration d'antigène accompagné ou non d'adjuvant, puis récolte de sang et/ou d'organes des animaux pour envoi à l'équipe scientifique qui pourra réaliser la purification et l'extraction des anticorps d'intérêt.

Le scientifique justifie par écrit avant chaque procédure l'absence de méthode alternative *in vitro* dans l'état de l'art, et s'engage à utiliser le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à la quantité d'anticorps désirée.

Les animaux sont maintenus en groupes sociaux dans un milieu enrichi avec du matériel de nidification ainsi que des tunnels en plastique. Une observation journalière des animaux est réalisée depuis leur réception jusqu'à la fin de l'étude, et des points limites sont mis en place, afin de garantir leur bien-être tout au long de l'étude

Le nombre de rats prévu pour ce projet est d'environ 30 par an soit 150 pour toute la durée du projet.

Ce nombre correspond à une estimation basée sur notre expérience des années précédentes.

13766 L'optogénétique est une technique novatrice basée sur l'utilisation de protéines photosensibles dans des cellules de rétines aveugles de manière à les rendre sensibles à la lumière. Cette thérapie particulièrement prometteuse pour le traitement de maladie telle que la rétinite pigmentaire (RP) a déjà donnée ses premiers résultats.

Cependant, aucune évaluation de l'éventuelle cytotoxicité que pourrait induire la lumière lors d'une activation en continue n'a été réalisée à ce jour.

Afin de répondre à cette question, nous injecterons la protéine photosensible d'intérêt en intraoculaire à un modèle murin de rétinite pigmentaire couramment utilisé par la communauté scientifique. Nous exposerons ensuite les animaux injectés à une lumière générée par des LEDs de haute densité (6h par jour pendant 5 jours).

La bonne expression de la protéine photosensible ainsi que l'intégrité de la structure du cristallin seront surveillés par des fonds d'œil.

Les effets cytotoxiques de la lumière seront analysés par des études histologiques des rétines après euthanasie des animaux.

Au total 180 animaux seront inclus dans ce projet en incluant tous les contrôles nécessaires.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse selon les procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les études *in vitro* qui peuvent l'être ont déjà été effectuées.

13767 La santé est un paramètre indispensable au bien-être et à la productivité des animaux d'élevage. En élevage porcin, le sevrage du porcelet constitue une étape critique compromettant la santé digestive et la santé générale. Une santé générale non-optimale en fin d'engraissement du porc peut également affecter la qualité sensorielle de la viande par des phénomènes d'oxydation des acides gras. Le projet vise à évaluer de nouveaux ingrédients fonctionnels à base d'algues marines sur les paramètres de santé à deux stades de l'élevage porcin :

- Chez le porcelet sevré, en tant qu'alternatives à l'utilisation d'antibiotiques pour promouvoir la santé générale (statut oxydant) et digestive (actions anti-microbienne, prébiotique ou sur les fonctions de défense physique de l'intestin).

- Chez le porc en finition, pour évaluer leur capacité à contrer les mécanismes d'oxydation dans l'organisme et à favoriser la qualité sensorielle de la viande.

Les mesures seront conduites sur 890 porcelets et 96 porcs en croissance, qui seront suivis pendant 3 à 6 semaines pour la caractérisation de leur croissance, de leur statut oxydant et de leur fonctionnalité digestive.

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Réduction : le nombre d'animaux dans chaque essai et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'analyse des éléments mesurés. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises pour répondre à l'objectif de l'étude et il n'est pas possible de réaliser cette étude autrement que sur un animal vivant. Raffinement : l'implantation d'un cathéter dans les essais 1, 2bis et 3bis sur les porcelets permettra le prélèvement quotidien de sang sans induire de souffrance ni de stress à l'animal. L'utilisation d'un logement en cages individuelles en post-sevrage est nécessaire afin de mesurer la consommation individuelle d'aliment. Pour tous les essais conduits sur les porcelets sevrés, les cages sont munies de parois transparentes et seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore et olfactif entre les animaux. Pour les essais conduits sur les porcs en finition, les loges sont munies de barreaux et en contact les unes aux autres, permettant un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux. Pour l'ensemble des essais, les dimensions du logement individuel permettent à l'animal de se déplacer et de se retourner librement.

13768 *Coxiella burnetii* est l'agent causal de la maladie zoonotique de la fièvre Q. Ce micro-organisme est répandu dans le monde entier, les réservoirs de l'agent pathogène sont nombreux chez les mammifères sauvages et domestiques. *Coxiella burnetii* peut être détectée chez les bovins, les moutons, les chèvres et autres mammifères domestiques, ainsi que les chats et les chiens. La transmission de l'infection se fait par voie aérienne par l'inhalation de particules contaminées en suspension dans l'air et le contact cutané ou muqueux avec les selles, l'urine, les sécrétions vaginales, le sperme, le lait, le placenta des animaux infectés. La période d'incubation est de 9 à 40 jours. Il s'agit probablement de la zoonose (maladie transmissible à l'homme) la plus contagieuse qui existe, car une seule bactérie suffit à infecter un homme. Coxevac®, le seul vaccin sur le marché des ruminants, est produit sur œufs de poule par un groupe pharmaceutique en Santé vétérinaire.

Le développement d'un vaccin de deuxième génération contre *Coxiella* est en cours et permettrait de produire l'antigène vaccinal dans une lignée cellulaire évitant ainsi le passage sur œuf. Une étude préliminaire à partir d'un vaccin de nouvelle génération pur et en comparaison avec le vaccin commercial Coxevac® pur a été faite et montre une bonne efficacité vaccinale contre *C. burnetii*. Afin de tester ce nouveau vaccin pour définir sa sensibilité vaccinale, nous allons mesurer l'efficacité de protection du vaccin de nouvelle génération par une étude dose-réponse chez la souris. Des études *in vitro* ont permis préalablement de définir les doses à tester *in vivo* pour ce nouveau vaccin. Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 80 souris OF1 dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Il n'existe aucune autre méthode permettant de démontrer l'efficacité vaccinale *in vivo*.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques (tests statistiques non paramétriques spécialement conçus pour comparer des groupes de petits effectifs) garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience de l'utilisation du vaccin commercial actuel.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en animalerie A3 en atmosphère contrôlée, à raison de 5 souris maximum par cage dans un environnement enrichi (tunnel, papier absorbant, nid). Toute médication pouvant interférer avec l'efficacité des vaccins est proscrite. Cependant les animaux sont suivis plusieurs fois par jour (enrichissement social) et télémetriquement pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites (tels que température, isolement, absence de toilettage) durant tout le protocole et de limiter la douleur induite. Avant de poser les puces, une anesthésie générale à l'isoflurane 4% est réalisée. Afin de diminuer la douleur de l'injection de la puce, un dépôt de prilocaïne 5% est fait, puis 30 minutes après, la puce est injectée. Un massage dorsal est effectué au niveau du point de pénétration de la puce.

13769 L'incidence des maladies rénales chroniques est en progression constante et représente actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 5,7 millions de personnes avec une progression de 2% par an. La maladie rénale chronique est une maladie longtemps silencieuse, d'évolution progressive et qui ne régresse pas. Son évolution est plus ou moins lente mais peut aller jusqu'à la perte totale de la fonction rénale. On parle alors d'insuffisance rénale terminale, nécessitant un traitement de suppléance par dialyse et/ou greffe de rein qui reste lourd de risques et de complications pour les malades. Les mécanismes à l'origine de cette détérioration du rein sont encore peu connus. Leur étude permettrait de ralentir cette évolution en évitant ou en traitant les facteurs qui l'aggravent.

Des études récentes suggèrent que la voie HIPPO, une voie moléculaire impliquée dans la régulation de la croissance des organes, pourrait jouer un rôle dans le développement des lésions rénales. En effet cette voie est connue pour être activée lors de la maladie rénale chronique. Elle déclencherait la mise en jeu de facteurs qui vont modifier le destin cellulaire (prolifération ou mort cellulaire) et participerait ainsi au processus lésionnel. Le but de ce projet est donc d'étudier le rôle de cette voie HIPPO dans le développement de la maladie rénale.

Comme le rein est un organe constitué de plusieurs compartiments, les différents modèles cellulaires ne suffisent pas pour étudier les mécanismes qui conduisent à la régression progressive de la fonction rénale. Pour cela nous disposons de plusieurs modèles de pathologies rénales expérimentales bien établis chez la souris comme la réduction néphronique (ablation partielle du rein), la néphropathie obstructive (obstruction d'un uretère) ou médicamenteuse (injection de molécules néphrotoxiques). Ce sont des modèles qui entraînent une altération progressive du tissu rénal. Nous appliquerons ainsi ces différents modèles de maladie rénale à des souris génétiquement modifiées.

Ce projet sur 5 ans utilisera 840 souris. Toutefois ce programme de recherche est développé afin de respecter les règles éthiques des 3R:

1) Remplacement : La culture cellulaire nous permet de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du rein et de la maladie rénale nécessite l'utilisation d'un modèle animal. 2) Réduction : nous utiliserons le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet.

3) Raffinement : La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique. Une surveillance quotidienne sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Dans le cas contraire on réalisera une injection supplémentaire d'antalgique, et on choisira en dernier recours l'euthanasie de l'animal. Les animaux bénéficieront d'un

programme d'enrichissement, comme des carrés de cellulose ou une maisonnette, défini par la cellule de l'établissement chargée de leur bien-être.

Ces études devraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir la progression de la maladie rénale chronique et retarder voire éviter aux patients la dialyse et la transplantation.

13770 Les muscles squelettiques assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Aussi, leurs altérations peuvent avoir des répercussions sur la fonction motrice et la qualité de vie des patients. Avec l'âge, une diminution de la force et de la masse musculaire est observée, on parle de sarcopénie, avec des conséquences sur la mobilité et l'autonomie des personnes âgées. Ce processus lié à l'âge peut également être fortement aggravé suite à un alitement prolongé lors d'hospitalisation par exemple. L'industrie du secteur agroalimentaire ou pharmacologique s'oriente vers le développement de produits qui visent à inverser ces altérations liées à l'âge et à l'immobilisation forcée. Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de nouveaux produits, alimentaires ou pharmacologiques, pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. Ainsi, nous envisageons de tester 5 produits en 5 ans.

Pour chaque composé testé, des rats Wistar âgés dont un membre postérieur aura été préalablement plâtré pendant 1 à 2 semaines maximum pour mimer une immobilisation forcée seront traités pendant une durée définie en fonction du composé et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par voie orale via l'eau de boisson ou l'alimentation, et associé au non à un entraînement des animaux. Les animaux seront répartis en maximum 5 groupes, selon le nombre de molécules ou doses à tester et les groupes référents nécessaires, avec un effectif de 30 animaux par groupe.

Un ensemble de paramètres sera évalué pour l'étude des effets des composés sur le comportement général et la fonction motrice des animaux. Ainsi, le poids des animaux, leur consommation alimentaire et hydrique seront évalués. La force d'agrippement et les capacités de déplacements horizontaux et verticaux seront analysés avant et à la fin du traitement, et ce après une période de familiarisation des animaux avec les différents systèmes utilisés. Cette répétition de mesures non invasives permettra ainsi de suivre de régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets des traitements sur chaque animal. Cette approche *in vivo* sera complétée par des techniques *in vitro* d'analyse de la fonction musculaire en vue d'identifier les cibles d'action des composés. Pour cela, en fin de traitement les animaux seront euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés et pesés, et les propriétés contractiles de faisceaux cellulaires isolés des certains muscles seront analysés. Au moment de l'euthanasie, des prélèvements sanguins d'un large volume de sang seront également réalisés afin d'effectuer des dosages hématologiques et biochimiques.

Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau pré-clinique les effets musculaires de composés à destination de l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique. Les études conduites sur des animaux âgés nécessitent de tenir compte de leur taux de mortalité. Ainsi, pour avoir un effectif final de 15 animaux par groupe, un effectif initial de 30 animaux par groupe est nécessaire. Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en tenant compte de la validité statistique, des contraintes des modèles et des approches expérimentales. Les méthodes utilisées sont validées et majoritairement non invasives, des périodes d'acclimatation et d'habituation sont systématiquement envisagées. Le suivi quotidien des rats sera renforcé pendant la période d'immobilisation. Lors de la réalisation des procédures expérimentales, un renforcement positif par récompense est mis en place pour limiter le stress des animaux. Aussi, des anesthésiques seront utilisés pour tout geste douloureux ou stressant. Au final, sur 5 ans, 750 animaux seront utilisés pour mener à bien ce projet.

13771 L'amélioration de l'efficacité alimentaire est un enjeu économique et environnemental majeur pour la filière cunicole par rapport aux autres filières viande. Elle permet de réduire la part du coût alimentaire mais également de limiter l'impact environnemental de l'élevage, en diminuant les rejets animaux.

Deux lignées de lapins sont sélectionnées sur l'efficacité alimentaire en unité expérimentale.

Dans la première lignée, le but est de sélectionner les animaux qui, pour une performance de croissance équivalente, consomment le moins d'aliment. Ce type de sélection a déjà été mis en œuvre chez les bovins, les ovins et les porcs ; l'efficacité alimentaire est bien améliorée, la vitesse de croissance et la composition corporelle sont peu affectées.

Dans la seconde lignée, parmi les animaux ingérant la même quantité d'aliment, le but est de sélectionner ceux qui ont la croissance la plus élevée. Afin de s'assurer que les animaux ingèrent bien l'intégralité de leur ration, le régime est rationné à 80% de la quantité d'aliment ingérée par des animaux contemporains nourris ad libitum. Ce rationnement est régulièrement utilisé par les sélectionneurs de lapins, essentiellement pour réduire les risques de problèmes digestifs. Une sélection de ce type a récemment été réalisée chez le porc. Elle a permis de montrer que l'efficacité alimentaire était améliorée, avec une augmentation de la vitesse de croissance et une diminution de l'adiposité des carcasses.

Les objectifs du projet sont de :

- comparer l'amélioration de l'efficacité alimentaire dans les deux lignées
- étudier les conséquences de la sélection pour chacune des lignées sur la santé, la croissance, l'indice de consommation
- Proposer des stratégies de sélection aux professionnels selon les objectifs de croissance et d'indice de consommation

Afin de réaliser la sélection génétique, 306 animaux sont étudiés par génération et par lignée. Ce qui représente un nombre total de 2142 animaux par lignée (4284 pour les 2 lignées) pour 5 années de sélection, soit 7 générations. Il s'agit du nombre minimum d'individu nécessaire pour éviter un accroissement excessif de la consanguinité, tout en garantissant un progrès génétique.

Réduction :

Le nombre d'animaux nécessaire pour 5 années de sélection est de 4284.

Parmi ces animaux, 1176 femelles et 504 mâles seront gardés. Les autres suivront le circuit classique de commercialisation.

Ce nombre d'animaux a été réfléchi de façon à :

- obtenir une consanguinité au plus égale à 1 % par génération
- obtenir un niveau d'intensité de sélection de 1.05

Remplacement : Ce programme de sélection génétique est un projet de recherche à objectif finalisé, c'est-à-dire que les connaissances acquises lors de ces travaux seront transmises et utilisées par les sélectionneurs cynicoles. C'est pourquoi nous avons recours à des animaux et que nos conditions expérimentales sont proches de celles des élevages conventionnels de manière à pouvoir transposer au mieux les résultats par la suite.

Raffinement :

Les 306 animaux (286 potentiels futurs reproducteurs et 20 témoins) par génération en croissance seront élevés dans des cages individuelles afin de contrôler l'ingestion d'aliment. Ces cages sont équipées de chainettes afin que les animaux puissent ronger celle-ci et jouer avec. Ils auront la possibilité de se toucher et de se voir car les parois de la cage ne sont pas pleines. Durant cette phase, aucun prélèvement ne sera fait sur les animaux, ils seront simplement nourris et surveillés. Les 20 témoins seront pesés à 29 jours, puis une fois par semaine. Les autres seront pesés à 29 et à 63 jours afin d'effectuer la sélection des futurs reproducteurs. Les animaux sont sélectionnés à la fin de leur contrôle, selon leur valeur génétique, estimée à partir de leur performance d'efficacité alimentaire.

Les 168 femelles et 72 mâles par génération seront élevés dans des cages individuelles correspondant aux normes d'élevage afin de :

- se rapprocher le plus possible de ce que l'on trouve sur le terrain et donc de pouvoir transposer nos résultats de recherche

- permettre aux femelles de s'occuper tranquillement de leurs portées sans avoir à la protéger des attaques des autres femelles lorsque celle-ci sont en groupes
- éviter les blessures que pourraient se faire les mâles lorsqu'ils sont élevés ensemble (morsures aux dos, aux yeux et aux oreilles)

Les reproducteurs auront une double biopsie à une oreille lors de la mise en place en tant que reproducteurs. Ceci est nécessaire pour extraire l'ADN de ces animaux. Un seul prélèvement (peau + cartilage) est réalisé sur l'animal. Le diamètre de la biopsie réalisé est de 3mm. Le matériel utilisé (pince + tube de prélèvement) est commercialisé par la société Allflex. Ces animaux seront gardés durant 4 IA, soit 46 semaines, puisque le renouvellement se fait sur les IA 3 et 4.

13772 La tuberculose (TB, abbréviation utilisée dans l'ensemble du projet) touche encore près de 10 millions de personnes chaque année dans le monde. Son traitement est long (6 mois dans le meilleur des cas) et doit être raccourci (une des priorités de l'OMS). De plus l'émergence et l'expansion de formes de tuberculose multi (MDR) ou extrêmement (XDR) résistantes aux antibiotiques, qui sont mortelles dans 50% des cas, exigent le développement de nouvelles thérapeutiques, dont des antibiotiques mais également des thérapies ciblant l'hôte pour lesquelles des résistances ne devraient pas apparaître. Ceci permettrait de traiter les patients en échec thérapeutique en évitant l'apparition de nouvelles résistances.

Des données préliminaires de notre équipe ont montré que la maprotiline (commercialisé sous le nom de Ludiomil), un antidépresseur utilisé chez l'homme et, permet un contrôle de *Mycobacterium tuberculosis*, le bacille de la tuberculose, *in vitro* dans des macrophages infectés. De façon remarquable, cette molécule n'a pas d'effet sur le bacille lui-même. Ces données suggèrent donc que la maprotiline agit comme un "booster" de l'immunité (molécule stimulant le système immunitaire) et pourrait être utilisé comme thérapie ciblant l'hôte, en complément de l'antibiothérapie.

Nous souhaitons à présent : 1/ tester l'efficacité de la maprotiline contre la TB *in vivo* chez la souris à différentes doses correspondant aux doses utilisées chez l'homme pour traiter la dépression, et 2/ évaluer l'éventuelle interférence (synergie ou antagonisme) de ce traitement avec l'antibiothérapie standard utilisée pour traiter la tuberculose chez l'homme.

Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (charges bactériennes). Le nombre d'animaux utilisés sera de 210 souris C57BL/6J. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs (n=5 animaux par groupe, l'expérience devant être réalisée 2 fois pour s'assurer de sa reproductibilité). Ces modèles ne peuvent pas être remplacés par des modèles cellulaires puisque l'effet de la maprotiline doit être étudiée au niveau de l'organisme entier (biodistribution, action sur de multiples types cellulaires etc.).

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à trois niveaux dans nos expériences : i) lors de l'instillation intranasale de *Mycobacterium tuberculosis* et ii) lors du développement de la tuberculose, iii) lors des gavages (5 jours/semaine). Les instillations intranasales, non douloureuses, seront réalisées sous simple anesthésie (Ketamine/Xylazine). Les gavages sont réalisés sur animal vigile pour éviter les fausses routes. Le volume de gavage est de 200 uL et la maprotiline est diluée dans du PBS. Une surveillance journalière du stress et de la douleur au cours et suite à ces traitements ainsi que lors de l'induction de la tuberculose expérimentale sera réalisée. Les points limites précoces choisis sont les changements dans l'aspect physique (attitude prostrée, poil terne), le comportement des animaux (isolement, déplacements limités) et la perte de poids (>15%).

13773 La production de truite arc-en-ciel en France s'oriente de plus en plus vers des poissons de grande taille (environ 2kg) servant notamment à la fumaison. Ces poissons sont pour la plupart des monosexes femelles stériles dont la production de chair n'est pas entravée par les changements physiologiques liés à la reproduction. La production de caviar de truite conduit également à

l'obtention de poissons de grande taille, mais leur chair, très altérée par la maturation sexuelle, présente des défauts de qualité majeurs. Alors qu'il y a un intérêt réel à réutiliser les animaux post-maturants pour élargir l'offre de truites de grande taille, les connaissances biologiques se rapportant à la récupération, à la qualité de la chair ainsi qu'au bien-être des femelles après ovulation sont pratiquement inexistantes. Avant le pic de ponte, une pratique d'élevage consiste à interrompre la distribution d'aliment car en fin de période d'ovogénèse les femelles arrêtent spontanément de s'alimenter pendant parfois plusieurs semaines. En pratique, les éleveurs imposent donc un jeûne à l'ensemble des femelles avant le pic de ponte et la durée de ce jeûne peut être longue pour celles qui vont maturer tardivement. Les plus précoces, une fois ovulées, sont stockées dans un autre bassin et la distribution alimentaire reprend. Aucune donnée n'existe dans la littérature concernant les conséquences d'une durée de jeûne plus ou moins longue sur la reprise alimentaire et le bien-être des truites au moment de la ponte. Ce projet vise donc à décrire l'impact de la durée du jeûne sur la récupération et le bien-être de ces animaux, bien-être qui sera évalué notamment par leur rythme cardiaque (indicateur de stress) et leur comportement de nage dans le bassin : accélérations brusques ("burst-swimming") et activité globale au moment de la distribution de l'aliment. Des outils de mesure implantables sont de plus en plus développés afin de rendre compte précisément de ces paramètres sur des longues durées ininterrompues. Pour ce projet, 6 bassins de 30 femelles de truite Arc-En-Ciel seront constitués selon leur date d'ovulation à partir d'un lot de souche Automnale. Ce lot d'origine sera mis à jeun dès la semaine 43, puis en fonction de leur date d'ovulation, les 6 lots seront constitués. Chacun d'entre eux auront donc différents temps de mise à jeun : 1 semaine (lot S44), 2 semaines (lot S45), 3 semaines (lot S46), 4 semaines (lot S47). Un lot S43 correspondra aux femelles qui n'auront pas été mises à jeun avant leur ovulation en semaine 43. Le lot S45 correspondra au pic de pontes et pourra donc être divisé en deux lots : un lot renourri (lot S45N) et un lot laissé à jeun pendant encore 2 semaines (lot S45J). Au moment de la ponte, lors de l'expulsion manuelle des oeufs (pratique couramment réalisée en élevage), des "biologgers" mesurant l'accélération et le rythme cardiaque seront implantés par chirurgie dans l'abdomen de 4 poissons "sentinelles" par bassin (=24 poissons). L'activité natatoire et le rythme cardiaque de ces poissons rendront compte de l'activité du groupe et des stress éventuellement rencontrés pendant les 4 mois qui suivront l'ovulation (des essais préalables de chirurgie seront réalisés sur 2 poissons). Trois repas par jour seront distribués à horaires fixes et la quantité d'aliment consommé sera précisément mesurée (distribué-refus alimentaire). Des tests de réactivité émotionnelle seront réalisés sur les femelles implantées (4 par bac) 1 mois et 4 mois après l'ovulation. Ces tests consistent à observer pendant 20 minutes à l'aide d'un enregistrement vidéo les comportements de peur (fuite, immobilisation) d'un individu placé en isolement social dans un environnement nouveau. Le taux de cortisol (hormone du stress) sera aussi mesuré par un prélèvement de sang réalisé sous anesthésie après 40 minutes. Au terme des 4 mois d'analyse du comportement des poissons, les 4 poissons "sentinelles" seront euthanasiés (24 poissons) après le dernier test de réactivité pour récupérer les implants et analyser les données d'accélérométrie et du rythme cardiaque. Les autres truites seront également euthanasiées pour des mesures de qualité des produits et des prélèvements de muscle.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 182 truites post-ovulées.

La règle éthique des 3Rs sera respectée :

Remplacement : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses comportementales de truites mises à jeun.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe expérimental est adapté au strict minimum pour la réalisation de tests statistiques.

Raffinement : Les poses d'implants seront réalisées par un vétérinaire ou par une personne formée à la chirurgie des poissons, dans le respect des conditions réglementaires. Un analgésique sera administré avant et après la chirurgie, réalisée sous anesthésie. Les truites seront élevées dans les conditions optimales pour l'espèce (température, photopériode, qualité d'eau, densité).

13774 Les neurones du cerveau communiquent entre eux grâce à des neurotransmetteurs au niveau de structures très petites, appelées synapses. Un de ces neurotransmetteurs est la dopamine. Les synapses qui libèrent de la dopamine sont impliquées dans le contrôle de nos mouvements et la sensation de bien-être. Elles sont affectées dans la maladie de Parkinson ainsi que dans les troubles psychiatriques comme la dépendance aux drogues et la schizophrénie. Il est donc très important de connaître cette synapse précisément afin de permettre le progrès des approches médicales à ces maladies graves. Dans ce projet, nous souhaitons réaliser la purification des synapses à dopamine afin d'analyser leur composition et leur fonction. Nous utilisons une technique de purification qui nécessite que ces synapses soient rendues fluorescentes. Nous utiliserons donc des cerveaux de souris dont les synapses à dopamine auront été rendus fluorescentes de façon ciblée avec des injections intracérébrales de marqueurs. Le cerveau des souris sera prélevé pour purifier les synapses à dopamine.

Pour l'heure, nous ne disposons pas de modèles *in vitro* de neurones dopaminergiques donc le recours aux animaux est indispensable. Cette étude durera 5 ans et nécessitera l'utilisation de 500 souris. Dans le respect du R de réduire, ce nombre de souris a été choisi suite à des données préliminaires et des données de la littérature afin de permettre une analyse quantitative suffisante en comparaison statistique. Le nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des résultats des mises au point. Les résultats de nos analyses seront publiés sous forme de banque de données afin de permettre leur utilisation la plus large par la communauté scientifique. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur. La soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque procédure et d'anesthésiques lors des chirurgies. L'optimisation continue des procédures afin de soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour le bien-être, les animaux vivent en groupe sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie. Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter toute souffrance prolongée aux animaux avec des mesures de soulagement mises en place (réchauffement et traitements vétérinaires si nécessaires).

13775 Ce projet consiste à mettre en place un dispositif de phénotypage fin automatisé du comportement des truies afin de comprendre les mécanismes associés à la capacité d'adaptation des truies au système de maternité. Il s'agit d'enregistrer l'activité des truies en temps passé dans différentes positions et d'identifier des changements de position à risque pour les porcelets (écrasement par leur mère), avec un accent mis sur l'agitation des femelles parturientes et en début de lactation. La mise en place de ce dispositif de mesure permettra d'obtenir des données quantitatives individuelles de l'activité sans recours aux analyses vidéos. Ces nouvelles mesures, comme l'analyse du temps passé dans différentes positions, sont très intéressantes à explorer dans cette espèce où la capacité d'adaptation comportementale est un paramètre majeur de la performance de production. D'autres variables de comportement pertinentes pour prédire l'aptitude maternelle naîtront de la modélisation des données élémentaires. Ce projet qui aborde la relation entre performance et activité maternelle donnera de nouvelles connaissances pour réduire la mortalité des porcelets en phase d'allaitement.

Le projet, qui se déroulera sur 5 ans, a pour but l'utilisation d'un outil embarqué pour mesurer les variations de comportement des truies, qu'elles soient maintenues en case bloquée ou case libre en maternité. L'objectif sera de déployer un dispositif d'enregistrements automatisés d'activité des truies avec des mesures sur 300 truies. Les truies seront suivies sur des périodes >24h au cours de la lactation, voire sur toute la période de leur entrée à la sortie de la maternité. La mise-bas+lactation des truies aura lieu de façon alternée en système de mise bas bloqué et en système de mise bas libre au cours de 4 mises bas successives. Pour le suivi de leur activité, elles seront équipées individuellement avec un harnais de fabrication artisanale qui permet la fixation du capteur (accéléromètre) sur le haut du dos de l'animal.

Cette étude respecte la règle des 3R:

- Remplacement : L'étude du comportement maternel des truies ne peut être réalisée que sur l'espèce concernée. Et le suivi de l'activité des animaux par fixation de l'accéléromètre au dos de l'animal est la meilleure solution trouvée pour étudier les comportements d'intérêt.
- Réduction : L'effectif de 300 truies suivies de façon répétée sur plusieurs portées (2 à 6) est nécessaire pour atteindre la puissance de dispositif qui permet l'étude des composantes génétiques des caractères comportementaux et leur mise en relation avec la survie des porcelets.
- Raffinement : La méthode de phénotypage est développée pour réduire les pertes en porcelets sous la mère. Les performances des truies seront comparées selon qu'elles sont élevées dans des conditions d'élevage conventionnel (case de mise bas bloquée) ou améliorée (case de mise bas libre). Le but de cette procédure est de repérer et étudier des truies capables de maintenir un bon niveau de production avec peu de pertes en porcelets dans les 2 systèmes. L'accès à la liberté constitue un enrichissement du milieu. La procédure d'équipement avec un harnais est rapide sur des truies qui ont été apprivoisées au préalable. La mise en place du système embarqué sera réalisée par du personnel formé et habitué. Les animaux seront surveillés quotidiennement.

13776 L'allergie alimentaire est devenue un sujet de première importance dans le domaine de la sécurité alimentaire. Elle peut être définie comme une réaction anormale de défense du corps à la suite de l'ingestion ou à l'exposition à un aliment. Elle est en augmentation et touche 4% des adultes et 8% des enfants dégradant de façon importante la qualité de vie de ces patients. Ceci représente un fardeau économique considérable pour les familles et la société.

Le blé est un élément de base de notre alimentation mais entraîne des réponses immunitaires (allergie, maladie cœliaque) chez certains individus. Les personnes allergiques sont exposées à des risques de symptômes sévères et à l'heure actuelle, la prise en charge de l'allergie alimentaire repose sur un régime d'éviction de/des allergène(s) et sur le recours à des médications d'urgence en cas d'anaphylaxie. Pour le blé, le régime d'éviction est contraignant au vu de son importance dans notre alimentation et aussi comme ingrédient (gluten). Des protocoles d'immunothérapie orale (ITO) peuvent être proposés aux patients en milieu hospitalier, avec des risques élevés de réactions indésirables et une efficacité médiocre.

Ce projet a pour but de proposer une alternative à l'ITO en proposant un protocole qui soit utilisable dans les pratiques cliniques de routine, mieux tolérés et plus efficace pour désensibiliser les patients. Des résultats obtenus précédemment ont pu démontrer qu'une immunothérapie basée non pas sur l'aliment mais sur des fragments d'allergènes serait capable de réorienter la réponse immune. Il s'agit d'une vaccination peptidique qui vise à diminuer les réponses des cellules effectrices de l'allergie et à augmenter les réponses immunitaires régulatrices et de tolérance. Pour se faire, nous allons utiliser des fragments peptiques (3 fragments) issus d'un allergène majeur du blé (α -gliadines) qui possède une forte immunogénicité mais n'est pas capable d'activer *in vitro* des cellules effectrices des symptômes allergiques. Ces peptides ont été sélectionnés *in vitro* et doivent maintenant être testés *in vivo* afin d'évaluer leur capacité à moduler l'allergie alimentaire et pour ce faire des souris seront sensibilisées au blé et vaccinées avec ces polypeptides de façon préventive.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 72 souris femelles Balb/c.

Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué (réduire, remplacer et raffiner). Il est en effet impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes *in vitro* ou *in silico*. Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. L'action d'un traitement de l'allergie ne peut être étudiée qu'en détails chez l'animal. Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique et a été réduit au maximum. Les animaux seront logés dans un environnement adapté avec une humidité relative et une température contrôlée et bénéficieront d'enrichissements. Enfin, le bien être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec évaluation quotidienne des signes généraux. Lors des procédures expérimentales, la mise en place d'analgésie et d'anesthésie mais aussi un suivi minutieux des points limites permet de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou

l'anxiété des animaux et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en terme de "bien-être" animal.

13777 Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent en France, tous cancers confondus : le deuxième chez les femmes et le troisième chez les hommes, âgés de 50 ans et plus. D'après les estimations, le nombre de ces cancers devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45 000 nouveaux cas annuels en 2020 (données INCA). Cette pathologie est donc un problème majeur en santé publique. L'objectif de ce programme de recherche est d'abord d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui participent à la formation et au développement du cancer colorectal. Des liens entre métabolisme et cancer sont de plus en plus décrits. A terme, notre but est de proposer de nouveaux axes de régulation du métabolisme des cellules cancéreuses afin d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques contre le cancer. Mais, il nous faut valider nos hypothèses chez l'animal. Ces nouvelles cibles pourraient viser le métabolisme et pourront être combinées à des approches thérapeutiques existantes, proposant ainsi de nouvelles combinaisons de traitement plus efficaces ou moins délétères pour les patients. Des greffes tumorales à partir de cellules murines transformées seront réalisées chez 48 souris femelles immunodéprimées « nude ». Ces modèles cellulaires ont été utilisés dans des expériences *in vitro* qui ont montré un lien entre prolifération cellulaire et métabolisme. Nous avons identifié deux molécules et trois cibles intéressantes dont le rôle sera validé grâce aux modèles *in vivo*. Nous avons optimisé notre procédure expérimentale pour utiliser le moins d'animaux possible mais suffisamment pour obtenir des résultats significatifs. Les dommages attendus sur les animaux vont être le développement de tumeurs (liés aux greffes de cellules transformées) ainsi que l'inconfort provoqué par les traitements (injection intra péritonéale). Les tumeurs seront sous cutanées pour le modèle de greffe sous cutanées. Les souris seront suivies tous les jours pour évaluer la croissance tumorale. A la fin des expériences, les tumeurs seront prélevées et conservées en paraffine et en congélation pour étudier les processus biologiques tels la prolifération, l'apoptose la mort cellulaire programmée et les grandes voies de signalisation cellulaires.

Lors de ce projet nous appliquons les 3R de la façon suivante:

Remplacer: des expériences *in vitro* ont été réalisées sur les cellules murines transformées traitées par plusieurs molécules ciblant le métabolisme.

Réduire: seules les 2 molécules qui ont montré le plus d'efficacité *in vitro* seront utilisées *in vivo*. De plus, les groupes d'animaux établis utilisent un nombre d'animaux suffisant pour avoir un résultat fiable.

Raffiner: grâce à l'enrichissement du milieu mis en place au sein de notre établissement et en choisissant des points limites suffisamment précoces (taille des tumeurs à 1000mm³). Ces points limites nous permettront d'obtenir des résultats scientifiquement valides tout en réduisant au maximum la durée de l'expérimentation et ainsi le développement des tumeurs.

13778 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), aussi appelée « bronchite du fumeur », est une maladie respiratoire chronique, le plus souvent liée au tabagisme. En France, la BPCO concerne 4 millions de personnes et elle est la 3ème cause de mortalité au niveau mondial. Cette maladie se caractérise notamment par une fibrose bronchique et péri-bronchique, associée à un déclin irréversible de la fonction respiratoire. L'évolution chronique de la BPCO est aggravée par des épisodes d'exacerbations, qui participent au remodelage bronchique. Les mécanismes du remodelage sont mal compris et ce processus n'est pas ciblé par les thérapeutiques actuelles. Nous nous intéressons à CXCR4 et CXCL12, des molécules impliquées dans l'attraction des cellules inflammatoires vers les tissus cibles. Le but de notre projet est d'évaluer le rôle de de l'axe CXCR4-CXCL12 dans le remodelage des voies aériennes dans un modèle de souris BPCO soumis à des exacerbations. Nous cherchons à comprendre le mécanisme à l'origine du recrutement dans le poumon de cellules inflammatoires, et notamment des cellules particulières appelées « fibrocytes », et le rôle de ces cellules dans le remodelage des tissus. Nous espérons que la réalisation de ce projet permettra d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la BPCO. Pour ce faire, 432 souris seront utilisées sur fond génétique sauvage (procédures n°1 et 2). De plus,

afin de déterminer plus précisément le rôle de l'axe CXCR4-CXCL12, 672 souris transgéniques seront utilisées (procédures n°3 et 4). Afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), les mesures mises en place sont les suivantes :

1) Réduire : se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, et nous réaliserons de multiples études *ex vivo* sur différents organes et selon différentes techniques.

2) Raffiner : pour diminuer la souffrance et l'angoisse des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les intubations et les prélèvements, analgésie locale pour les prélèvements, raffinement des conditions d'hébergement, vérification par le comité sur le bien-être des animaux) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer : il n'existe pas de modèle *in vitro* actuellement permettant d'étudier la pathophysiologie de la BPCO, maladie complexe touchant plusieurs composants (tels que le muscle lisse bronchique, l'épithélium et les cellules inflammatoires) et mettant en jeu plusieurs organes (moelle osseuse, compartiment vasculaire et poumon). Grâce à un modèle de souris BPCO, nous pouvons envisager une meilleure compréhension des phénomènes.

13779 Les métapneumovirus aviaires (AMPV) sont responsables, sur le terrain et chez différentes espèces d'oiseaux d'élevage (poulet, dinde, canard, pintade, faisan), de troubles respiratoires de type sinusite ou rhinotrachéite, ainsi que de troubles génitaux (chutes de ponte) chez les animaux en âge de se reproduire. En conditions expérimentales, ces virus induisent des signes respiratoires modérés (jetage nasal, râle, éternuement) avec un rétablissement au bout de 7 à 10 jours après l'infection.

Les travaux antérieurs du laboratoire de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé animale pour les AMPV ont contribué à mettre en évidence une diversité génétique et antigénique chez les AMPV, répartis en quatre sous-groupes, A, B, C et D. Afin de toujours être en mesure de réaliser les analyses de diagnostic sérologique, en réponse aux demandes au niveau national sur cette thématique, il est nécessaire de produire de nouveaux stocks d'antisérum de référence.

Cette demande vise à produire des sérums de référence anti-AMPV de chaque sous-groupe sur les hôtes cible (poulet, dinde, canard, pintade et faisan). Chaque expérimentation se déroulera sur une période de 32 jours maximum dans une animalerie adaptée et faisant intervenir 15 sujets. Cet effectif fournira des volumes suffisants de sérum de référence pour éviter des expérimentations répétées. Le projet fera appel à un maximum de 300 animaux soit 60 poulets, 60 dindes, 60 canards, 60 pintades et 60 faisans.

A trois semaines d'âge, les animaux seront inoculés par voie intra-nasale avec le virus d'intérêt. Des prises de sang seront effectuées deux semaines plus tard pour déterminer le statut sérologique des animaux en ELISA vis-à-vis du virus inoculé. Si les niveaux d'anticorps atteignent des niveaux suffisants pour être utilisés comme sérum de référence, les expérimentations se termineront à ce moment de l'expérimentation. Dans le cas contraire, un rappel sera effectué. Ce rappel consiste à inoculer les animaux une seconde fois avec le même virus et par la même voie. Le statut sérologique des animaux sera recontrôlé deux semaines plus tard de la même façon que précédemment. En l'absence de méthodes alternatives, le projet nécessite le recours à l'expérimentation animale.

Les animaux seront élevés en groupe et bénéficieront d'un enrichissement social, ils auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les animaux seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

13780 La carcinose péritonéale est une pathologie de très mauvais pronostic au cours de laquelle une multitude de métastases se développent dans la cavité péritonéale. Ces lésions sont la cause principale de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de cancer colorectal, ovarien, et de l'estomac notamment car les chirurgies et chimiothérapies sont peu efficaces.

Dans la carcinose péritonéale, la résistance aux traitements pourrait être due à la capacité des cellules tumorales d'adapter leur métabolisme à différents environnements, leur permettant d'acquérir l'énergie nécessaire à leur développement. De manière générale, les cellules cancéreuses activent des mécanismes de détoxification en augmentant leur production énergétique pour survivre aux thérapies anti-cancéreuses. Le ciblage du métabolisme des cancers est donc une approche attractive pour ralentir la progression tumorale et augmenter l'impact des thérapies. De récentes études ont démontré la validité de cette hypothèse.

Dans cette étude, nous souhaitons étudier l'impact de 3 régimes alimentaires sur le développement tumoral et l'efficacité de chimiothérapies. Cette information nous permettrait d'établir de nouveaux protocoles cliniques plus efficaces pour les patients atteints de carcinoses péritonéales.

Dans une première expérience, nous déterminerons la dose efficace de la chimiothérapie. Dans une seconde approche, les souris seront randomisées dans 4 différents groupes et recevront un régime alimentaire normal, un régime kétogénique, un régime pauvre en sérine-glycine, ou un régime suppléé en metformine. Les souris recevront ensuite la greffe tumorale et l'effet de la chimiothérapie sera évalué. Dans une 3ème expérience, le traitement le plus efficace obtenu sera répété afin d'investiguer la survenue de marqueurs spécifiques d'efficacité thérapeutique, et de déterminer leur apparition dans le temps.

Dans ce projet nous utiliserons 312 souris Balb/c nu/nu correspondant au nombre minimum d'animaux nécessaires pour une étude fiable des différents résultats, conformément à la règle des 3R :

Remplacer/réduire: Le nombre de souris a été estimé sur la base de calculs de puissance, déterminés mêmes à partir des informations disponibles dans la littérature. Nous l'avons déterminé comme étant le nombre minimum de souris nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Dans cette étude l'utilisation d'animaux est irremplaçable.

Raffiner : Nous utiliserons des souris Balb/c nu/nu, qui représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Toutes les expériences pouvant entraîner gêne ou douleur seront effectuées sous anesthésie gazeuse. La croissance des tumeurs sous cutanées n'entraîne pas de gêne de mobilité et sera suivie par mesure au pied à coulisse. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

13781 Notre structure permet l'hébergement et l'expérimentation animale sur souris dans un environnement Exempt d'Organisme Pathogènes Spécifiques (EOPS). Lorsque des équipes de recherche souhaitent intégrer notre plateforme mutualisante, il nous est indispensable d'assurer la conformité de leurs lignées de souris avec notre statut sanitaire. L'objectif est de réduire tout risque de contamination microbienne de notre animalerie, et de garantir un statut sanitaire stable et connu pour obtenir de meilleurs résultats lors des recherches ultérieures sur ces lignées. Afin de maintenir et/ou de produire (selon les demandes des utilisateurs) ces lignées qui sont des modèles expérimentaux de pathologies humaines, il nous faut mettre en place des techniques de décontamination par redéivation ainsi que des techniques de revitalisation de ces lignées. Nous utiliserons soit du sperme et des ovocytes, soit des embryons, frais ou congelés.

La décontamination par redéivation permet de transférer des animaux issus d'animaleries de statuts sanitaires inconnus vers des animaleries de statut sanitaire contrôlé. La décontamination par redéivation permet l'élimination d'un grand nombre de microorganismes pathogènes (viraux, bactériens, parasitaires) pour favoriser l'élevage ultérieur dans les meilleures conditions.

Une phase d'entraînement aux techniques de redéivation et revitalisation sera menée pour optimiser la maîtrise des différentes procédures et les valider au sein de notre structure - deux personnes doivent être formées en parallèle : Fécondation *in vitro* ou *in vivo* puis transfert

d'embryons par voie chirurgicale ; Insémination artificielle non chirurgicale ; Fécondation *in vitro* ou *in vivo* puis transfert d'embryons non chirurgical (NSET) : total 135 souris maximum par personne. Si les techniques sont maîtrisées rapidement, nous n'utiliserons pas la totalité des animaux escomptés

La seconde phase est dédiée à l'intégration réelle d'une cinquantaine de lignées à redériver dans la structure : nous comptons 30 souris par campagne de redériver.

Total global du projet = 1815 souris.

Remplacement : nous n'utiliserons que des souris d'intérêt pour les chercheurs et nous proposerons la cryopréservation de sperme en attendant la production de descendants.

Réduction : Les différentes méthodes proposées permettent de réduire considérablement le nombre de femelles utilisées par rapport à des accouplements classiques. Les méthodes non chirurgicales, si elles peuvent être privilégiées (taux de réussite inférieurs à la méthode chirurgicale : nombre de souriceaux nés/nombre d'embryons transférés), permettent de s'affranchir d'anesthésie, d'analgésie et de complications post-opératoires.

Le nombre de mâles et de femelles utilisées par lignée pour les transferts d'embryons est le minimum requis pour obtenir les animaux d'intérêt suite à la redériver. Les mêmes mâles vasectomisés seront utilisés pour les 2 phases mais renouvelés 2 à 3 fois.

Raffinement : Les animaux ont tous une période d'acclimatation d'au moins une semaine et leur milieu de vie est contrôlé.

Dans les deux phases, les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées de 500 cm². Nous veillerons à l'enrichissement du milieu de vie (tunnels, bûchettes en peuplier, matériel de nidification).

Lors de chirurgies, les animaux reçoivent une anesthésie et une analgésie adéquates pour éviter stress et douleur.

Les animaux seront observés quotidiennement, week-end et jours fériés compris.

Si un point limite est atteint (perte de poids de 15% du poids corporel avant l'opération pour les mères receveuses, activité réduite, absence de prise d'aliment et de boisson, démarche anormale, absence de toilettage, rougeur, gonflement, traces de griffures si l'animal se gratte, diarrhée, problèmes de gestation et de mise bas), une surveillance accrue et des soins adaptés seront mis en œuvre en accord avec le vétérinaire référent. Si mise à mort nécessaire, elle sera réalisée sous CO₂, ou dislocation cervicale sous anesthésie isoflurane.

13782 Le glioblastome multiforme (GBM) est le cancer du cerveau le plus fréquent, caractérisé par un développement rapide des cellules tumorales qui infiltrant profondément les tissus sains. Cette tumeur reste incurable. Le traitement de référence consiste en une exérèse suivie du protocole de Stupp : une radiothérapie et/ou une chimiothérapie concomitante, 4 à 6 semaines après l'acte chirurgical. Ce délai permet aux tissus de cicatriser et au patient de récupérer. Cependant, des récurrences tumorales apparaissent dans la plupart des cas à la bordure de la résection, dues aux cellules tumorales résiduelles. Ainsi, la médiane de survie des patients est d'environ 14 mois, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 5%. Une thérapie locale post-résection du GBM, entre l'acte chirurgical et le protocole de Stupp, semble une bonne stratégie pour limiter la présence des récurrences. L'utilisation d'un implant capable de délivrer une thérapie ciblée vers les cellules résiduelles de GBM semble être une voie prometteuse. Actuellement, il existe un implant qui s'appuie partiellement sur cette stratégie. Il s'agit du Gliadel®, un disque de polymère solide (wafer), permettant la libération localisée d'un agent anticancéreux. Cependant, cet implant a une efficacité modeste puisque l'actif anticancéreux n'est pas spécifique des cellules de GBM. Il présente d'autres désavantages tels que la difficulté d'ajustement dans la cavité de résection et des complications post-opératoires. Récemment, nous avons développé un nouvel hydrogel de nanoparticules. Il s'agit de nanocapsules lipidiques (NCLs) capables de s'auto-associer pour former une structure de type collier de perle. Cette structuration permet d'obtenir un hydrogel avec une rigidité se rapprochant de celle du cerveau. Ces NCLs peuvent être chargées en actif anticancéreux. Lorsque cet hydrogel

est administré dans un environnement composé d'eau, la libération progressive des NCLs est observée. De plus, une fois toutes les NCLs libérées, une suspension liquide est retrouvée. Ainsi, après administration de cet hydrogel dans la cavité de résection, les NCLs se détachent progressivement et il ne reste plus d'implant une fois qu'elles sont toutes libérées. Cet hydrogel a déjà été testé avec succès sur un modèle murin de résection de GBM avec une efficacité thérapeutique prometteuse. Néanmoins, ces NCLs ne sont pas spécifiques des cellules de GBM. Ainsi, nous avons développé un hydrogel de NCLs de deuxième génération, basé sur la même structure que celle décrite précédemment. Un peptide capable de cibler les GBM a été ajouté à la surface des NCLs sans affecter la formation de l'hydrogel. Les résultats *in vitro* ont montré l'efficacité du ciblage des cellules de GBM, ainsi que l'efficacité thérapeutique par rapport à l'hydrogel de première génération. Ainsi, nous souhaitons tester ce nouvel hydrogel sur le modèle murin de résection de GBM déjà utilisé, ainsi que d'associer cet implant post-résection avec la chimiothérapie utilisée dans le protocole de Stupp. Il s'agira de développer un implant anticancéreux utilisable lors de la prise en charge des patients atteints de GBM, implantable par le neurochirurgien après la résection du GBM. La forme hydrogel permettra une application plus pratique de l'implant, adapté pour couvrir parfaitement la cavité de résection, sans aucun produit de dégradation. La prise en charge du GBM sera donc améliorée par la mise en place d'un traitement spécifique comblant le gap entre la résection chirurgicale et l'initiation du protocole de Stupp. Le projet sera divisé en deux parties. La première consistera à tester différents gels de NCLs couplées ou non à différentes concentrations en peptide de ciblage, chargées ou non à différentes doses d'un actif anticancéreux : la Gemcitabine modifiée. Il s'agira de déterminer quelle combinaison aura l'activité anti-cancéreuse la plus efficace. Puis, le gel d'intérêt sera testé en combinaison avec du témozolomide par voie orale. Il s'agira d'évaluer l'effet complémentaire des deux traitements, voire une synergie thérapeutique. En prévision des difficultés possibles avec la résection tumorale, les groupes seront formés de 12 animaux afin d'assurer 10 animaux inclus correctement dans l'étude. Nous avons 19 groupes pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale des hydrogels de NCLs et 9 groupes pour l'étude des effets complémentaires des traitements hydrogel et témozolomide, ce qui fait un total de $19 \times 12 + 9 \times 12 = 336$ souris. Tous ces travaux respecteront la règle des 3R en remplaçant ou à défaut, en réduisant le nombre d'animaux utilisés. Des premières expérimentations sur des cultures de cellules tumorales ont déjà été réalisées. Les NCLs en suspension couplées au peptide montrent un ciblage préférentiel des cellules tumorales par rapport aux NCLs non couplées, ainsi qu'une cytotoxicité plus prononcée lorsque celles-ci sont chargées en actif anticancéreux. Cependant, tester l'efficacité prolongée de l'implant par libération progressive des NCLs sur une longue période de temps ne peut pas être réalisé *in vitro*. De plus, l'objectif du projet étant de se rapprocher de la prise en charge thérapeutique actuelle chez l'Homme, une résection tumorale dans un cerveau pour tester les nouveaux traitements ne peut pas être réalisée *in vitro*. Ainsi, l'expérimentation animale avec un modèle déjà bien caractérisé est donc une étape indispensable et non remplaçable (remplacement). Les études sur l'efficacité thérapeutique des gels seront réalisées sur un premier lot de souris femelles (car le modèle est basé sur ce type de souris). Puis selon les résultats, un seul gel sera testé sur de nouvelles souris femelles en combinaison avec du témozolomide et permettra ainsi de réduire au strict minimum le nombre d'animaux (réduction). Une grille d'évaluation de la douleur sera utilisée au cas où un animal montrerait une souffrance qui impose l'arrêt de l'expérimentation. Au fur et à mesure des études précédentes, nous avons pu affiner cette grille et la prise en compte de la douleur animale. Enfin, un suivi quotidien du bien-être des animaux sera réalisé et plusieurs personnes seront impliquées dans ce suivi (raffinement).

13783 Les odilorhabdines (ODLs) sont une nouvelle classe d'antibiotiques découverte en 2011 et en cours de développement pharmaceutique. Elles présentent un mécanisme d'action original d'inhibition de la translation bactérienne. Les candidats médicaments de la première génération présentent une activité sur les entérobactéries et sont principalement développés pour des indications d'infections urinaires et intrapéritonéales compliquées. Les candidats de seconde génération qui seront étudiés dans ce projet, ont un spectre d'activité élargi vers *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* avec toutefois les mêmes indications. L'objectif de ce projet est de réaliser une partie de

l'évaluation préclinique entrant dans le développement industriel de candidats médicaments de deuxième génération, et ceci en réalisant 3 types d'études :

- Une étude de tolérance de 120 composés de deuxième génération après administration sous cutanée à la souris.
- Une étude d'efficacité simple et discriminante à dose unique de ces 120 molécules dans un modèle d'infection péritonéale chez la souris.
- Une étude d'efficacité dose croissante pour les 24 meilleurs composés présélectionnés dans l'étape précédente sur le même modèle murin d'infection péritonéale.

Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet est de 2490.

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

-Remplacer : Les 120 composés testés dans ce projet ont déjà eux-mêmes été présélectionnés à partir d'un nombre plus important de composés (plus de 2000) dans des phases préliminaires *in vitro* du développement. Aucun remplacement par des techniques de substitution *in vitro* ne sera possible à ce stade de développement préclinique.

-Réduire : Une étude statistique a été utilisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux permettant d'obtenir une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats.

-Raffiner : Les animaux sont hébergés entre 3 et 5 par cage dans un environnement A2 enrichi (rouleaux de papier, bâtonnets à ronger) avec l'eau et la nourriture qui seront mises à disposition "ad libitum". Le modèle d'infection utilisé dans ce projet est un modèle aigu et les études d'efficacité *in vivo* seront réalisées sur un temps court (maximum 5h). Dans ce contexte, aucun traitement antalgique ne sera administré aux animaux afin d'éviter le risque d'interactions pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique non encore identifié.

13784 Les maladies rares et neurologiques souffrent d'une absence de prise en charge thérapeutique. Le développement au cours de la dernière décennie de biothérapies comme les protéines recombinantes humaines ou les anticorps monoclonaux, ouvre des perspectives très prometteuses de traitement de ces pathologies.

L'efficacité thérapeutique de ces macromolécules dépend fortement de leur capacité à accéder aux organes et/ou cellules cibles. Or, du fait de leur poids moléculaire très élevé, ces molécules ont une faible distribution tissulaire notamment dans des organes possédant une barrière physiologique avec le sang comme le cerveau ou l'œil. Cela constitue un obstacle majeur pour le développement de ces nouvelles biothérapies.

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

Nous développons de nouvelles méthodes de vectorisation de ces molécules c'est-à-dire que nous les couplons à un système spécifique des barrières physiologiques qui doit permettre leur passage au travers de ces barrières. L'objectif de ce projet est d'évaluer la capacité de ces nouvelles molécules à atteindre leur cible d'action. Comme ces barrières physiologiques sont susceptibles d'être modifiées dans certaines pathologies, ces études sont pratiquées soit chez des souris saines soit dans des modèles transgéniques murins de ces pathologies.

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

Les études dans des modèles transgéniques doivent permettre de s'assurer que cette meilleure biodistribution est conservée en situation pathologique. Enfin cette approche *in vivo* permettra aussi d'identifier des produits ayant une biodistribution réduite dans les autres tissus afin de diminuer les effets secondaires liés au traitement. De plus, les biomarqueurs d'engagement de la cible pourront aussi être mesurés dans les échantillons biologiques issus de ces études. Toutes ces données

permettront de sélectionner les meilleurs candidats pour des études de démonstration d'activité thérapeutique et de préciser les doses et les designs de ces études.

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

L'efficacité de ces méthodes/technologies est testée dans un premier temps *in vitro* dans des modèles cellulaires, organotypiques ou biophysiques. Ces modèles permettent de sélectionner les meilleurs candidats médicamenteux. Cependant, ces modèles bien que reproduisant certaines caractéristiques des barrières physiologiques, ne permettent pas de prendre en compte la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, en particulier la coexistence de plusieurs barrières physiologiques et les différentes voies de métabolisme. La validation complète de ces nouvelles méthodes/technologies de vectorisation ne peut être faite qu'avec des modèles *in vivo*.

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

La manipulation des animaux, les techniques d'administration et de prélèvement sont réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec de l'enrichissement et des interactions quotidiennes avec le personnel. De plus des points limites spécifiques sont identifiés pour les modèles pathologiques afin de limiter la contrainte liée au développement des pathologies.

Le nombre maximal d'animaux utilisés dans ce projet sera de 2000 souris sur une période de 5 ans.

13785 Le projet consiste à améliorer l'étude de l'efficacité alimentaire à savoir le ratio entre les quantités de tissus déposés en croissance et la quantité d'aliment consommée des porcs en utilisant un nouveau critère de sélection. Aujourd'hui, le critère utilisé est basé sur l'efficacité alimentaire simple donc le ratio poids total pris par l'animal sur le poids d'aliment ingéré sur la période étudiée ; classiquement l'engraissement.

Comme c'est le muscle qui est valorisé lors de sa commercialisation des porcs, le projet propose d'utiliser le poids de muscle au lieu du poids total de l'animal. Ceci implique, pour connaître le poids de muscle déposé, de disposer d'une méthode de mesure de la composition corporelle *in vivo*. Ce projet a pour but d'étudier l'utilisation des mesures par un scanner à rayons X pour déterminer la teneur en muscle des porcs *in vivo*.

De fait, la présente saisine explicite la procédure de prise d'images au scanner à rayons X sur animaux vivants pour l'espèce porcine. Le scanner à rayons X est en général utilisé pour prendre des mesures de composition corporelle sur un même animal à des âges différents. Il permet de réaliser ces mesures *in vivo* et sans douleur ; auparavant, cette mesure était faite par dissection après sacrifice. La saisine décrit la procédure complète d'anesthésie et de prise de mesure au scanner sur porc vivant. La demande est faite pour une durée de 3 ans durant lesquels 1000 animaux seront analysés. Cette démarche s'inscrit dans la règle des 3 R :

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

- Raffinement : La mesure par imagerie externe, non-invasive, évite le sacrifice et génère peu de stress.

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

13786 Le but de notre projet est de déterminer le rôle de l'activité neuronale dans la mise en place de connexions fonctionnelles et spécifiques entre les neurones, ces connexions étant indispensables au bon fonctionnement du cerveau. Notre système d'étude est le réseau formé entre deux régions du cerveau, l'olive inférieure et le cervelet (réseau olivo-cérébelleux), bien connu pour son rôle dans le contrôle de la motricité. Des études anatomiques et électrophysiologiques ont progressivement révélé une cartographie précise de la connectivité établie entre les neurones de l'olive inférieure et les neurones du cervelet. Le réseau olivo-cérébelleux est organisé en modules, chaque module traitant différentes informations sensorielles et motrices spécifiquement. Il est nécessaire de comprendre comment cette organisation est établie au cours du développement pour comprendre comment les informations sont traitées et codées dans le réseau olivo-cérébelleux pour permettre un contrôle moteur adéquat. De plus, cela nous permettra de comprendre comment des déficits dans cette organisation contribuent à l'apparition de certaines pathologies et troubles neurologiques du mouvement. Cette organisation modulaire ne peut être reproduite par des systèmes cellulaires. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux pour pouvoir comprendre les mécanismes complexes permettant le développement de ce réseau chez les mammifères. Le modèle utilisé sera la souris. En effet, la souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse *in vivo* de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elle permet également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines.

Pour répondre à notre problématique, nous modifierons l'activité neuronale au cours du développement postnatal en réalisant de la privation sensorielle. Nous analyserons ensuite comment cette privation sensorielle modifie l'organisation modulaire et l'expression de molécules contrôlant la formation du réseau olivo-cérébelleux. La privation sensorielle sera réalisée soit en coupant les moustaches des souriceaux, soit en les élevant dans le noir jusqu'au sevrage. Les manipulations de souriceaux seront minimales voir inexistantes, dans le cas du protocole sur le noir, et n'entraîneront donc pas de dommages. Mais afin de garantir la survie des souriceaux manipulés, les manipulations s'effectueront selon un protocole optimisé pour être minimal et éviter de stresser les petits et leur mère et la souche de souris utilisée sera des souris blanches réputées pour être de très bonne mère qui n'abandonnent pas leurs petits. Le nombre d'animaux utilisé dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides. Ainsi, il est nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Nous prévoyons donc l'utilisation d'un total de 960 souris sur 5 ans. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post-hoc lorsque ce test sera significatif. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les zones d'élevages de ces portées seront placées dans des zones plus isolées des bruits et passages, les cages du projet bénéficieront des nouveaux éléments d'enrichissement que la structure du bien-être animale de notre unité scientifique met actuellement en place.

13787 Le système immunitaire est activé en cas d'infection par les bactéries et les virus mais également au cours du développement de cancer. Plusieurs études se sont déjà attachées à identifier le rôle des différents globules blancs au cours d'un cancer et d'autres études ont montré que la chimiothérapie pouvait moduler les proportions des différentes populations de globules blancs. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe montrent que le Cisplatine (une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du poumon) recrute des populations particulières de globules blancs, appelés ILCs. Les données de la littérature indiquent que les ILCs pourraient être à l'origine de

structures appelées TLS (Structures Lymphoïdes Tertiaires) qui pourraient permettre la mise en place d'une réponse immunitaire anti cancéreuse efficace. C'est pourquoi nous souhaiterions étudier (1) ce qu'il se passe dans les tumeurs après que les souris aient reçu un traitement par Cisplatine, et (2) l'impact que cela a sur la réponse anti tumorale.

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous étudierons la proportion de chaque population de globules blancs au cours du temps dans les tumeurs de souris non traitées, traitées par Cisplatine ou par Oxaliplatine (une chimiothérapie qui ne modulent pas les globules blancs de types ILCs). Pour confirmer que les observations sont pertinentes, nous utiliserons 2 modèles de tumeurs : TC-1 (lignée de cancer du poumon) qui possèdent un fort infiltrat en globules blancs et 4T1 (lignées de cancer du sein) qui possède un faible infiltrat. Ainsi, les souris C57Bl6 ou Balbc recevront une injection de 2×10^5 cellules tumorales dans la patte. Dix jours après l'injection, lorsque la tumeur est mesurable, les souris seront traitées avec du PBS, 6 mg/kg de Cisplatine ou 7 mg/kg d'Oxaliplatine. Les souris mises à mort après 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours de traitements. Les tumeurs seront isolées, dissociées et les populations de globules blancs seront étudiées par cytométrie de flux.

Une fois que nous aurons confirmé que les ILCs sont recrutées et que nous aurons déterminé à quel moment elles le sont, nous déterminerons l'impact que ce recrutement a sur les autres globules blancs présents dans la tumeur. Pour cela, nous utiliserons des souris Nude (ne possédant pas de lymphocytes T) ou des souris Rag2gc (ne possédant pas de lymphocytes T, B et NK). Nous reconstituerons le système immunitaire de ces souris avec des compositions variables des populations de globules blancs et nous reproduirons les expériences précédentes afin de déterminer dans quelle mesure la présence ou l'absence de certains globules blancs interfère avec les effets immunologiques du Cisplatine.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que deux fois et les rates et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs et sacrifice) seront réalisées sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Cette étude nécessitera 315 souris C57Bl6, 315 souris Balbc, 630 souris Nude et 630 souris Rag2gc.

13788 L'arthrose est la maladie articulaire la plus répandue. Actuellement en France, 10 millions de personnes souffrent de cette pathologie. Elle se caractérise par une destruction du cartilage qui s'étend à toutes les structures de l'articulation, notamment à l'os et au tissu synovial. A ce jour, il n'existe que des traitements symptomatiques de l'arthrose qui visent à soulager la douleur. A long terme l'unique solution est la pose d'une prothèse articulaire soulageant le malade sur une période de 15 à 20 ans. Le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques est donc primordial pour retarder ou éviter la progression de l'arthrose. La rapamycine, utilisée en clinique pour éviter le rejet de greffe, semble pouvoir enrayer le processus arthrosique en revitalisant les cellules du cartilage. Pour l'exploration cette nouvelle piste thérapeutique, plusieurs paramètres vont être privilégiés : 1) l'injection directement de la rapamycine dans l'articulation, ce qui limitera par ailleurs la diffusion dans l'organisme, 2) l'utilisation d'une forme nanoparticulaire qui facilitera la rétention de la rapamycine dans l'articulation.

L'objectif de notre projet consiste à évaluer le devenir de la rapamycine lors de son injection intra-articulaire (genou) chez le rat sain sous forme de nanoparticules ou sous forme native en comparaison avec la forme native injectée par voie intraveineuse (référence). Les paramètres évalués seront 1) la diffusion progressive de la rapamycine dans le sang et 2) son temps de rétention articulaire. La dose utilisée sera celle réputée efficace dans les modèles expérimentaux d'arthrose (formes libre ou nanoparticulaire). A ce titre, des prélèvements sanguins et articulaires seront réalisés à 15, 30, 60, 180, 360 minutes, 24h et 7j après injection de rapamycine.

Pour cela, 116 rats sains, seront utilisés dans ce projet séparés en 5 groupes répartis selon la modalité d'administration de la rapamycine. Au sein de chaque groupe, les animaux seront répartis en 7 sous-groupes de 4 animaux correspondant aux temps d'études. La mise à mort des animaux est nécessaire pour étudier la diffusion dans l'organisme (sang, foie, rein) tout comme la rétention articulaire, à l'aide de dosages spécialisés.

- Groupe 1 : Ces rats ne subiront aucun traitement et serviront de groupe témoins naïfs pour les études pharmacocinétiques et histologiques. Réalisation de prélèvements sanguins avant mise à mort et de prélèvements articulaires après mise à mort des animaux. 4 rats seront prévus à T0. Il n'y a aucune nécessité de prévoir des animaux à chaque temps dans ce groupe.

- Groupe 2 : Nous procéderons à une injection intraveineuse à T0 (veine de la queue) de rapamycine. Réalisation de prélèvements sanguins avant mise à mort et de prélèvements articulaires après mise à mort des animaux.

- Groupe 3 : Nous procéderons à une injection intra-articulaire de rapamycine T0. Puis réalisation de prélèvements sanguins avant mise à mort et de prélèvements articulaires après mise à mort des animaux.

- Groupe 4 : Nous procéderons à l'administration intra-articulaire de nanoparticules vides à T0. Puis réalisation de prélèvements sanguins avant mise à mort et de prélèvements articulaires après mise à mort des animaux. Ce groupe permettra d'évaluer la tolérance intra-articulaire du vecteur par des analyses histologiques.

- Groupe 5 : Nous procéderons une seule administration de nanoparticules de rapamycine à T0 (dans du sérum physiologique). Réalisation de prélèvements sanguins avant mise à mort et de prélèvements articulaires après mise à mort des animaux.

Deux procédures seront réalisées : 1) l'injection intraveineuse ou intra-articulaire de la rapamycine sous anesthésie gazeuse, 2) les prélèvements sanguins réalisés sous anesthésie générale puis mise à mort pour prélèvements intra-articulaires et tissulaires. La dose de rapamycine utilisée n'est pas toxique pour l'animal. Cependant, nous surveillerons quotidiennement les animaux. Ceux présentant des anomalies du comportement (vocalisation, pilo-érection, cachexie) des troubles du mouvement pouvant traduire une neurotoxicité, et/ou une perte pondérale supérieure à 20% après injection de la rapamycine seront mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. L'apparition éventuelle d'une infection au niveau du site d'administration (notamment articulaire) nous obligerait à mettre à mort l'animal. Notre expérience en la matière (injections articulaire) réduit considérablement la probabilité d'apparition de ce genre d'évènement.

Notre étude permettra d'évaluer la pertinence d'une injection intra-articulaire de rapamycine sous forme nanoparticulaire : rétention prolongée dans le genou et moindre diffusion dans l'organisme. Cette étude sur le devenir du médicament dans l'organisme ne peut se faire que sur modèle animal (Remplacement). Dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum nécessaire soit n=4 rats/groupe/temps et est suffisant pour les études statistiques (Réduction). Après injection puis prélèvement sanguin (anesthésie gazeuse, Raffinement), les rats seront mis à mort selon la méthode réglementaire par dislocation cervicale sous anesthésie générale. Le tissu synovial, le liquide synovial et les genoux seront prélevés sur les animaux morts afin d'effectuer le dosage de la rapamycine et des études histologiques et immuno-histologiques pour évaluer l'état des tissus articulaires (membrane synoviale et cartilage).

13789 Le traumatisme crânien (TC) est la cause la plus fréquente d'invalidité permanente chez les patients de moins de 40 ans. Aux lésions cérébrales primaires, engendrées par l'impact, se surajoutent, pendant les heures et les jours qui suivent, des lésions secondaires liées directement à la constitution des lésions primaires elles-mêmes, ainsi qu'à leurs conséquences physiopathologiques. Néanmoins certains travaux ont montré que les patients traumatisés crâniens étaient à risque de développer un syndrome post-commotionnel précocément après le TC. Le syndrome post-commotionnel est une association de symptômes pouvant survenir dans le suite d'une commotion ou d'un traumatisme cérébral. Il est l'association de troubles somatiques (céphalées, vertiges, tremblements, déficit sensitivo-moteur) et psychiatriques (irritabilité, agitation, agressivité, troubles

mnésiques, comportements à risque) pouvant avoir un retentissement socio- professionnel important.

De plus, le traumatisme de l'enfant comporte certaines spécificités dues à l'immaturation du cerveau et pourrait notamment être responsable de troubles du développement psycho-moteur.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le retentissement cognitif d'un traumatisme crânien modéré de l'enfant. Pour cela nous utiliserons un modèle de traumatisme crânien modéré par lâcher de poids d'une faible hauteur sur des souris mâles de 7 jours (Septième jour de la vie postnatale : P7). Dans ce modèle, il sera étudié les déficits comportementaux au stade adulte soit à 45 jours de vie (P45). Le nombre de souris utilisées sera de 100 dans ce projet d'une durée de trois ans. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (3%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Toutes les souris effectueront le test afin de limiter le nombre d'animaux pour obtenir des mesures des performances.

Nous travaillerons sur deux groupes d'animaux :

- les animaux traumatisés
- les animaux non traumatisés (Sham)

Le test comportemental effectué afin de déterminer les défauts cognitifs éventuellement induits par le traumatisme crânien sera le test de mémorisation par le NORT (Novel Object recognition test). Le NORT est un test comportemental couramment utilisé pour l'étude des divers aspects de l'apprentissage et la mémoire chez les souris. Il est assez simple et peut être complété sur une période de 5 jours : 3 jours d'accoutumance, formation et deux jours de test. Au cours de la formation, la souris est autorisée à explorer 2 objets identiques. Les jours de test, l'un des objets formation est remplacé par un nouvel objet. Parce que les souris ont une préférence innée pour la nouveauté, si la souris reconnaît l'objet familier, il passe la majeure partie de son temps à l'objet nouveau.

Puis à la fin des tests comportementaux, les animaux seront euthanasiés et les cerveaux seront prélevés afin d'effectuer les analyses des tissus pour étudier les lésions de la substance blanche.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

Remplacement : L'étude de l'impact du traumatisme crânien sur les réseaux neuronaux à distance du TC ne peut être envisagée qu'« *in vivo* ». Au vu de notre expertise et des données de la littérature le modèle que nous utiliserons sera la souris non transgénique.

Réduction : Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. L'analyse statistique de nos données nécessite n=25 animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative. C'est le nombre minimal de souris nécessaire pour l'obtention d'une puissance statistique suffisante avec les modèles expérimentaux de comportement. Néanmoins nous prévoyons de dupliquer l'étude, c'est la raison pour laquelle nous prévoyons 100 animaux.

Raffinement : La procédure de traumatisme (durée inférieure à 2 minutes) sera réalisée sous anesthésie générale inhalatoire par Isoflurane. Une analgésie sera réalisée en la présence de signes de douleur (en fonction d'un score établi). Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera que le retour au sein du nid se fait bien. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs : à la phase aiguë, on surveillera la fréquence respiratoire, la recoloration des extrémités, et le tonus ; à distance du TC on réalisera une surveillance régulière de la prise de poids, de l'absence de troubles du comportement (isolement, agressivité). Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

13790 Le syndrome de Cohen (SC) est un syndrome rare caractérisé par l'association de nombreux déficits et malformations incluant le développement incomplet du cerveau, un retard psychomoteur,

une insuffisance dans la production de certaines cellules immunitaires et des défauts métaboliques. Ces problèmes métaboliques incluent l'obésité et un risque élevé de diabète. Le diabète est une élévation anormale du taux de sucre dans le sang qui peut avoir des conséquences graves si elle n'est pas traitée (cécité, amputation...). Récemment, le développement non suspecté et non expliqué d'un excès de graisse dans le foie (stéatose hépatique) par un jeune patient atteint du syndrome de Cohen, a mis évidence un manque de connaissance nécessaire à la bonne prise en charge des patients.

Le syndrome de Cohen est causé par des mutations dans le gène VPS13B. Nous travaillons donc sur une lignée de souris qui modélise le syndrome de Cohen grâce à un défaut dans le gène *Vps13b* pour anticiper certaines complications dont pourraient souffrir les patients atteints du syndrome de Cohen. Aussi, nous souhaitons étudier la fonction de *Vps13b* dans le métabolisme et dans la survenue de l'obésité, du diabète et de la stéatose hépatique associés au syndrome de Cohen. A l'heure actuelle, une seule étude publiée par nous-même apporte des informations sur ce sujet. Cette étude a été faite sur des cellules isolées et ne tient donc pas compte de l'ensemble des régulations métaboliques à l'échelle du corps. C'est pourquoi nous avons choisi la souris pour effectuer une nouvelle étude qui permettra de comprendre les différents effets du corps sur les problèmes métaboliques et permettra peut-être une meilleure prise en charge médicale des patients.

Pour notre étude, les souris mutantes, présentant le syndrome de Cohen, et les souris contrôles sauvages seront alimentées une fois adulte (à partir de l'âge de 2 mois) par un régime gras et ce pendant 2 mois afin de savoir si les mutantes sont plus susceptibles aux dérèglements métaboliques (obésité, diabète et stéatose hépatique). Nous utiliserons une technique de mesure de la masse grasse *in vivo* ainsi que des techniques qui permettent de suivre l'apparition de taux élevés de sucre dans le sang (diabète). La prise alimentaire et la dépense énergétique seront suivies dans des cages dites métaboliques. L'absorbance de gras par les intestins sera aussi mesurée afin de savoir si elle est différente entre souris mutantes et sauvages et peut être responsable des différences de poids observées. Afin de s'assurer qu'un niveau de stress différent chez les souris mutantes n'est pas à l'origine des observations faites, nous effectuerons des tests de mesure du stress des animaux. Lors de ce projet chaque animal aura cinq jours au cours desquels il recevra une injection et aura quelques gouttes de sang prélevées pour mesurer son taux de sucre et d'insuline (la molécule qui sert à faire baisser le taux de sucre dans le sang). Le stress induit chez les animaux est à mettre en balance avec le bénéfice d'une meilleure prise en charge des patients et de l'anticipation d'un diabète qui pourrait être lourd de conséquence chez ces patients qui ont déjà beaucoup d'autres problèmes physiques.

La conformité à la règle des 3R a été scrupuleusement respectée de la manière suivante. Dans un souci de remplacement, nous n'effectuons sur la souris uniquement les tests qui nécessitent un animal. En effet, nous avons déjà mis en place des études *in vitro* sur des cellules de foies, de cellules de tissus adipeux et des cellules de patients. Cependant, les maladies comme le diabète dépendent de l'interaction entre beaucoup d'organes (pancréas, foie, cerveau et tissu adipeux). Ainsi, on ne peut se passer du recours aux animaux pour notre étude. Aussi, le métabolisme dépendant beaucoup des hormones, il nous est donc nécessaire de faire l'étude sur les deux sexes. La totalité de ce projet utilisera 120 souris sur une durée de 2 ans. Dans un souci de réduction, les mêmes animaux seront utilisés pour l'ensemble des analyses (tests comportementaux, Echo-MRI, tests d'insulinorésistance, tests de tolérance au glucose, mesure en cage métabolique, tests comportementaux, tests d'absorption des lipides et études histologiques subséquentes). Afin d'utiliser le minimum d'animaux possible nous effectuerons des tests statistiques non-paramétriques lors de nos analyses de résultats. Aussi, notre laboratoire possède actuellement cinq personnes travaillant sur le syndrome de Cohen ; nous avons donc mis en place une banque d'organes où nous plaçons en fin de procédures sur les animaux l'ensemble des organes impliqués dans le syndrome de Cohen afin qu'ils soient disponibles pour l'ensemble de l'équipe dans d'autres projets. Dans un but de raffinement, les tests d'insulinorésistance et de résistance au glucose ne seront effectués qu'en début et fin de protocole pour éviter aux animaux un stress répétitif. Enfin, nous emploierons des méthodes d'analgésie locale pour les prélèvements sanguins.

13791 L'infection urinaire masculine, fréquemment appelée prostatite, est souvent présentée comme l'association d'une fièvre et de symptômes du bas appareil urinaire (brûlures mictionnelles, envie fréquente d'uriner, impossibilité d'uriner). Source d'hospitalisation chez des patients de plus en plus âgés, des difficultés thérapeutiques apparaissent de plus en plus fréquemment par la complexité des bactéries pathogènes rencontrées et notamment l'augmentation des résistances. L'infection urinaire masculine, bien que présentée parfois comme une pathologie « banale » est pourtant fréquemment source d'infections graves et parfois, en l'absence de prise en charge urgente, mortelles. L'évolution de l'écologie bactérienne à l'origine parfois de difficultés thérapeutiques incite à mieux comprendre ces différents mécanismes physiopathologiques et pharmacodynamiques qui pourraient permettre d'aborder sous un angle nouveau le traitement de l'infection urinaire masculine qui devient de plus en plus complexe. Une meilleure efficacité des traitements débutera dans un premier temps par une meilleure compréhension de la distribution des antibiotiques au sein du tissu prostatique infecté. De nos jours, des techniques comme la microdialyse offre la possibilité de mieux appréhender la diffusion des antibiotiques au sein des tissus aussi bien chez l'animal que chez l'homme, ceci permettant une optimisation de la prise en charge ultérieure. Toutefois de nos jours, les études de distribution tissulaire des antibiotiques au sein du tissu prostatique sont quasiment inexistantes contraignant souvent à une prise en charge du traitement des patients le plus souvent empirique.

L'objectif de ce projet est de mettre au point et de valider un modèle d'infection de la prostate chez le rat dans le but de faire des études de la distribution d'antibiotiques par microdialyse chez des rats présentant une prostatite bactérienne.

Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet est de 128 au total.

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

-» Remplacer» : La distribution pharmacocinétique systémique et/ou tissulaire d'un médicament ne peut pas être évaluée par des méthodes *in vitro*. Elle peut être cependant évaluée par quelques méthodes *ex-vivo* mais qui nécessite aussi l'utilisation d'animaux. De plus, différents modèles de prostatite chez le rat co-existent dans la littérature mais il n'existe pas actuellement des données permettant de sélectionner le modèle le plus adapté, le plus reproductible et le plus prédictif concernant les souches bactériennes que nous souhaitons étudiées.

-» Réduire». Une étude statistique a été utilisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux permettant d'obtenir une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats.

-» Raffiner». Les animaux sont hébergés dans un environnement A2 enrichi (rouleaux de papier, bâtonnets à ronger) avec l'eau et la nourriture qui seront mises à disposition "ad libitum". Les techniques chirurgicales sont réalisées sous anesthésie sous une analgésie pré-opératoire et post-opératoire (buprénorphine). Le suivi des animaux permettant d'identifier des signes de souffrance, caractérisés par l'état du pelage, le comportement du rat, la perte de poids sera également réalisé.... L'ensemble de ses signes sera collecté dans une grille d'évaluation du bien être animal engendrant des prises de décisions comme l'addition d'une dose d'analgésique supplémentaire si nécessaire.

13792 La supplémentation en protéines est un défi dans la production animale biologique. L'utilisation de flux protéiques importés sur des fermes gérées de manière organique limite le recyclage des nutriments. Le fractionnement des légumineuses fourragères, par le biais de nouvelles techniques de récolte et du bio-raffinage, en aliments riches en protéines et en fibres pour les monogastriques et les ruminants, respectivement, pourrait augmenter l'autosuffisance agricole avec les aliments pour animaux. Le projet proposé permettra de produire des connaissances innovantes sur la façon d'améliorer l'autosuffisance dans la production animale biologique. Ces connaissances seront mobilisées pour produire des innovations directement utilisables par les agriculteurs et l'industrie de l'alimentation pour produire des ressources alimentaires basées sur le fractionnement de la luzerne et le trèfle.

L'objectif de cet essai est d'étudier les valeurs protéiques et énergétiques de produits issus de la luzerne et du trèfle violet pour le porc en croissance. Un total de 35 animaux seront utilisés dans

cette étude. 2 Animaux supplémentaires seront éventuellement ajoutés au cas où nous devrions remplacer des porcs dans le groupe initial de 5 prévu pour la mesure de la digestibilité iléale.

La valeur protéique sera mesurée dans un dispositif comprenant 5 porcs de 35 kg en début d'expérience. 5 régimes contenant respectivement (régime sans légumineuse, régime avec 25% d'ensilage de luzerne, régime avec 25% d'ensilage de trèfle violet, régime avec 20% de concentré protéique de luzerne, régime avec 20% de concentré protéique de trèfle violet). Deux animaux supplémentaires seront prévus dans le cas où il nous faudrait remplacer des animaux dans le groupe initial des 5 porcs. Enfin d'expérience, les animaux recevront un régime dépourvu de protéines pour évaluer les pertes endogènes. Pour chaque période de mesure, les animaux seront collectés pendant 3 jours après 4 jours d'adaptation aux régimes.

La valeur énergétique des 5 régimes sera mesurée sur 30 porcs en 2 répétition successives de 15 porcs. Les animaux seront collectés pendant 7 jours après 14 jours d'adaptation aux régimes.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement: les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des acides aminés et de l'énergie et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Raffinement: Pour la mesure de la digestibilité des acides aminés, l'anastomose iléo-rectale est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digesta de la fin de l'intestin grêle. Elle est mise en place sous anesthésie générale et une analgésie est appliquée pendant l'intervention et au cours de la période post-opératoire avec un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience. Réduction : le nombre d'animaux (n=5 +2 pour la digestibilité iléale + 30 pour la digestibilité fécale) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux et la durée d'hébergement dans des cages à digestibilité.

13793 Le lymphome folliculaire (LF) est un cancer des cellules immunitaires de type lymphocytes B. Il se développe au sein des ganglions lymphatiques mais aussi, dans près de 70% des cas, au niveau de la moelle osseuse. Cette pathologie, malgré des avancées thérapeutiques notables, reste à l'heure actuelle incurable et sa fréquence est en constante augmentation dans les pays industrialisés. Les cellules tumorales de LF se caractérisent par l'accumulation d'altérations génétiques que les progrès récents du séquençage ont permis de préciser. Ces multiples anomalies favorisent la croissance tumorale et la résistance au traitement en agissant directement sur la survie ou la prolifération des cellules tumorales mais aussi en favorisant le dialogue de ces cellules tumorales avec les cellules qui l'entourent, les cellules du microenvironnement. Cependant, l'absence de modèles *in vitro* et *in vivo* pertinents limite l'étude fine des interactions entre ces cellules du microenvironnement et les cellules B tumorales dans leurs dimensions spatiale, cinétique et moléculaire.

Parmi les altérations génétiques s'accumulant chez les cellules B tumorales des patients atteints de LF, le plus important conduit à une forte expression d'un facteur de survie, qui va conférer ainsi un avantage de survie à la cellule B porteuse de l'anomalie. Nous possédons deux lignées de souris transgéniques mimant cette surexpression. Mais ces modèles ne reproduisent pas fidèlement le développement du LF. Nous avons donc souhaité étudier l'impact d'altérations additionnelles sur le développement de la pathologie pour tenter de créer un modèle s'approchant au plus près de la pathologie humaine. Nos deux modèles murins ont donc été croisés avec des souris porteuses d'autres altérations affectant fréquemment les cellules B tumorales de patients atteints de LF.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de 684 souris, en adéquation avec la règle des 3R :

-le Remplacement: les événements géniques physiologiquement impliqués dans le développement des cellules B et pathologiquement impliqués dans le développement des cancers de type lymphome, sont à l'heure actuelle impossibles à reproduire *in vitro*. C'est pourquoi il nous est indispensable de travailler dans un contexte *in vivo* où ils ont lieu. De plus, nous étudions plus particulièrement l'impact du microenvironnement sur le développement de ce cancer, mais cet impact passe par des interactions entre cellules qui sont dépendantes de l'architecture en 3D des

tissus et donc impossibles à reproduire fidèlement *in vitro*. Le recours à des animaux est donc indispensable pour cette étude.

-la Réduction: afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, les expérimentations ont été mises en place de manière à utiliser le moins de souris possible tout en extrayant le plus d'informations, notamment en utilisant plusieurs organes (moelle osseuse, ganglions, rate et sang) pour réaliser les différentes analyses sur un même animal. Enfin les protocoles d'immunisations seront réalisés par étapes afin de définir les meilleures conditions expérimentales pour notre étude sur une première série de souris, puis à les appliquer aux autres modèles.

-le Raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées à savoir des locaux confinés, des portoirs ventilés, de l'eau et de la nourriture ad libitum, ainsi qu'un maximum de 5 animaux/cage. Egalement aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage.

13794 Il est établi que le blocage du récepteur minéralocorticoïde (RM) par un antagoniste (ARM) limite la morbidité et la mortalité dans les maladies cardiovasculaires (insuffisance cardiaque, postinfarctus), ainsi que dans d'autres défaillances d'organes en phase terminale.

Dans le contexte de la transplantation rénale, nous souhaitons caractériser l'influence d'un ARM sur un modèle porcin de DONNEUR dit à coeur arrêté (modèle de don après arrêt circulatoire) en situation d'allogreffe. Typiquement, l'allogreffe consiste à prélever un rein à un animal dit "DONNEUR", puis à le transplanter à un autre animal, dit "RECEVEUR". Dans notre étude, les deux reins (gauche ET droit) seront prélevés chez les animaux DONNEURS, et chacun de ces deux reins sera ensuite transplanté à un RECEVEUR différent.

De plus, l'une des spécificités de cette étude sera l'administration de l'ARM à l'animal DONNEUR avant de réaliser la greffe rénale à l'animal RECEVEUR.

Nous utiliserons un effectif total de 36 animaux (Porcs mâles, âgés de 3 mois), 12 animaux DONNEURS (fournissant 24 greffons rénaux) et 24 animaux RECEVEURS. Les animaux RECEVEURS seront répartis en 4 groupes de 6 animaux ; ils seront suivis durant 3 mois après la transplantation.

En termes des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) par définition, la transplantation n'est modélisable que sur un organisme vivant ; par conséquent, 3R-Remplacement ne peut s'appliquer à notre projet. Par contre, la proximité anatomique (rein multilobé et multipapillaire), physiologique, et métabolique avec l'Homme fait du modèle porcin "Large White" un modèle de référence présentant les avantages suivants :

i) Possibilité de modéliser des situations très proches de la clinique humaine (anesthésie, chirurgie, etc) ; en corollaire, les praticiens/chirurgiens expérimentés maîtrisent les protocoles et assurent une utilisation éthique et optimale des animaux (réduction des pertes et réduction des demandes en animaux) => 3 R (Réduction).

ii) Ce protocole d'allogreffe fournira un nombre important de reins collatéraux (48 = 24 reins gauches + 24 reins droits), issus des animaux RECEVEURS : ces reins "additionnels" seront utilisés dans des protocoles indépendants (par exemple perfusion ou conservation *ex vivo*) et viendront étoffer notre base de données expérimentale. Ce protocole exploitera donc au mieux les organes disponibles => 3 R-Réduction.

iii) En parallèle, une prise en charge des animaux est réalisée avec un suivi pré- et post-opératoire : prises de sang, mise en cages métaboliques individuelles (dans un local maintenu à une température d'environ 21°C), mise à disposition d'eau et de nourriture, enrichissement de l'environnement par contact visuel et olfactif en box individuels adaptés et mise à disposition d'objets (jouet, morceau de bois, cordelette à machouiller), application médicamenteuse si nécessaire afin de diminuer au maximum la douleur (/mal-être) associé(e)s (administration d'anesthésiques-analgésiques) => 3R-Raffinement.

13795 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI) regroupent la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Les causes seraient multifactorielles impliquant à la fois le facteur

environnemental, la susceptibilité génétique, le microbiote intestinal et le système immunitaire. Les interactions entre ces systèmes complexes aboutiraient dans certains cas au développement de ces maladies. Ce sont des maladies chroniques évoluant par poussées inflammatoires causant des troubles gastro-intestinaux invalidants qui altèrent la qualité de vie des patients. Il n'existe à ce jour, pas de traitement curatif. Les patients atteints sont souvent traités par des anti-inflammatoires, des immunomodulateurs ou encore des corticoïdes possédants de nombreux effets secondaires.

La recherche d'un nouveau traitement ciblé est donc essentielle. La molécule testée a déjà prouvé ses effets anti-inflammatoires dans d'autres études *in vivo* chez des modèles inflammatoires (modèle de SEP). Le but de cette étude est d'évaluer les effets thérapeutiques de cette molécule chez un modèle murin de MICI. Ce modèle consiste à ajouter du Dextran Sulfate de Sodium (DSS) dans l'eau de boisson des souris. L'animal développe alors une colite quelques jours après le début du traitement.

Des souris femelles seront réparties aléatoirement dans 5 groupes expérimentaux : un groupe de souris type sauvage, un groupe de souris DSS non traité, un groupe de souris DSS traité avec une molécule de référence, un groupe de souris DSS traité avec un isotype contrôle ainsi qu'un groupe de souris DSS traité avec notre molécule d'intérêt. Les animaux seront traités suite à l'apparition des premiers symptômes à l'image de ce qui peut se passer chez le patient (présence de sang dans les selles ou diarrhées). Des analyses seront ensuite effectuées pour déterminer l'effet du traitement sur l'aspect clinique, sur le profil inflammatoire et biochimique mais aussi sur la survie.

Cette étude sera réalisée sur un total de 300 animaux. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain:

- 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum (notamment grâce à la présélection des molécules dans un projet précédent) tout en permettant de générer des données statistiques solides ; des études statistiques basées sur les résultats d'autres études nous permettent de prédire le nombre d'animaux suffisant pour obtenir les réponses à nos interrogations.
- 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux.
- 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes et le développement multifactoriel de la maladie ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

Ce projet rentre dans le cadre d'un projet plus global ayant pour but de développer des molécules à potentiel thérapeutique et de les amener aux essais cliniques chez l'Homme.

13796 Le glioblastome est une tumeur cérébrale actuellement incurable malgré un traitement combinant chirurgie puis chimiothérapie et radiothérapie, ce qui nécessite de trouver rapidement des nouvelles solutions thérapeutiques. Un facteur limitant l'efficacité des traitements existants pour le glioblastome est la présence des cellules tumorales qui ne peuvent pas être retirées par résection chirurgicale et ne répondent pas aux agents de chimiothérapie. De plus, il a été récemment démontré que les réponses physiologiques du cerveau après résection chirurgicale peuvent créer un microenvironnement qui favorise la formation des récidives tumorales locales.

Dans ce projet, nous souhaiterions évaluer les réponses physiologiques (ex. inflammation, angiogenèse, vascularisation, recrutement des cellules immunitaires) induites par la résection chirurgicale chez l'animal (souris C57BL/6) porteur de glioblastome et leur impact sur la formation des récidives locales.

Au total, un maximum de 111 souris est prévu pour la totalité de l'étude. Dans le respect de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement), le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant pour mettre en évidence les réponses cérébrales induites par la résection chirurgicale et leur éventuel impact sur la formation des récidives. Les modèles expérimentaux et les techniques chirurgicales utilisés dans ce projet sont parfaitement maîtrisés par les expérimentateurs, qui seront capables de réduire au minimum la souffrance et le stress des animaux afin de garantir leur bien-être et la fiabilité des données collectées au cours de l'étude. Les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 5 individus

par cage (365x205x140 cm, 530 cm²) afin d'éviter le stress de l'isolement. Outre l'anesthésie générale durant toutes les procédures expérimentales (injection des cellules tumorales, résection chirurgicale et application d'une fenêtre pour imagerie intravitale), de l'analgésie en pré- et post-opératoire est aussi prévue. Afin d'obtenir le plus d'informations sur le microenvironnement de la résection tumorale, nous suivrons la progression de la pathologie et des réponses à la chirurgie dans le temps par imagerie microTEP/CT (21 souris), par microscopie intravitale biphotonique (45 souris) et par cytométrie de flux post-mortem (45 souris). Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie) sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort sans délai. Cette étape de validation *in vivo* des effets induits par la résection chirurgicale est indispensable afin de développer des traitements qui puissent cibler ces réponses cérébrales et réduire l'apparition des récurrences tumorales. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine.

13797 La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) est une maladie rare et très grave qui entraîne une insuffisance cardiaque droite nécessitant à terme une transplantation cœur-poumon. Cette pathologie est caractérisée en particulier par une fibrose intimale et par une multiplication des cellules formant la paroi des vaisseaux (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires), ces facteurs diminuant la lumière des vaisseaux, augmentent les résistances vasculaires pulmonaires et participent à l'hypertension pulmonaire. Les mécanismes impliqués dans ce remodelage et qui portent de façon prédominante sur les veines et les veinules pulmonaires ne sont pas élucidés. Nous avons identifié le gène responsable de la forme héréditaire de la maladie chez l'homme, EIF2AK4. Nous disposons de plusieurs lignées de rats portant des mutations du gène EIF2AK4 afin d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la prolifération des cellules vasculaires. Ces animaux ont été suivis par échocardiographie et certains ont été étudiés au niveau hémodynamique. Ils ne développent pas de pathologie ni d'hypertension pulmonaire. Nous allons donc essayer de déclencher la MVOP chez ces rats mutés. Ces expériences *in vivo* sont indispensables pour prouver le rôle du gène que nous étudions dans le développement de la maladie.

D'autre part, nous isolerons des cellules vasculaires de ces animaux afin d'effectuer des études *in vitro* sur le niveau d'expression de différents gènes mesurée au niveau des ARN et des protéines, leurs capacités de prolifération et de différenciation.

La MVOP sera déclenchée dans les différentes lignées de rats chez lesquelles nous avons invalidé le gène EIF2AK4 par la technique CrispR-Cas9. L'objectif est d'induire la survenue de la maladie chez le rat invalidé pour EIF2AK4 mais pas chez le rat de génotype sauvage. L'étude de ces animaux comprendra l'administration de facteurs pouvant induire la MVOP car ils ne la déclenchent pas de façon spontanée. Ces agents sont soit médicamenteux (asparaginase utilisée chez l'homme dans le traitement de certaines leucémies), soit par nébulisation intra-trachéale d'une suspension d'adénovirus codant pour la 5-lipoxygénase, ou son contrôle (vecteur adénoviral vide), ou encore une suspension de LPS d'*E. coli*. Après quelques semaines d'observation au cours desquelles, des échographies cardiaques sont régulièrement pratiquées, les animaux sont anesthésiés et des mesures hémodynamiques sont réalisées, suivies du prélèvement du cœur et du poumon afin d'effectuer des analyses de biologie moléculaire et cellulaire et de biochimie. Environ 300 rats sont prévus pour des procédures expérimentales de classe sévère (MVOP sévère avec insuffisance cardiaque). Nous utiliserons 20 animaux minimum par procédure et par groupe afin de permettre de bonnes analyses statistiques même si certains animaux meurent en cours d'expérimentation (lors de la prise de pression ou lors des procédures de classe sévère).

Chaque groupe d'animaux correspond à une question scientifique précise convergeant vers le même objectif consistant à déclencher la MVOP chez le rat invalidé pour EIF2AK4, comme vu plus

haut. Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1/ Le suivi de l'hypertension pulmonaire et de l'hypertrophie ventriculaire gauche sera réalisée par échocardiographie cardiaque à différents temps sur le même animal. Dans la mesure du possible, le même groupe d'animaux contrôles sera utilisé pour comparer l'effet des différents facteurs. Les poumons prélevés chez les animaux serviront pour les différentes analyses : histologiques, immuno-histochimiques, biochimiques et pour les mesures d'expression des gènes (transcriptomique, protéomique).

2/ Quel que soit le protocole, les facteurs donnés aux animaux seront sélectionnés au préalable soit selon leurs effets d'après la littérature (médicaments donnés chez l'homme, adénovirus administré chez l'animal uniquement). Seuls les facteurs les plus pertinents seront testés chez l'animal.

L'étape des tests d'induction *in vivo* chez le rat est cependant indispensable pour prouver *in vivo* la réalité des liens entre le gène responsable de la maladie chez l'homme et le déclenchement de la maladie et surtout comprendre le mécanisme moléculaire conduisant au développement de la maladie.

Chaque groupe d'animaux correspond à une question scientifique précise et différente. Les animaux seront surveillés tous les jours.

3/ Les cellules isolées à partir de certains animaux pourront dans certains cas être isolées, amplifiées et maintenues en culture et ainsi éviter le sacrifice de nouveaux animaux.

Par la suite, nous vérifierons les résultats obtenus avec des animaux par l'analyse de coupes de poumons de patients atteints de MVOP (poumons issus de greffe) ou de cellules obtenues à partir d'échantillons humains.

Les résultats attendus sont une meilleure compréhension des cellules et des voies de signalisation à l'origine de la prolifération des cellules vasculaires pulmonaires et nos résultats auront une forte valeur ajoutée sur le plan thérapeutique en raison de la possibilité d'identification de nouvelles cibles pour le traitement de la MVOP.

13798 La déficience en céramidase acide est un groupe de maladies autosomiques récessives. Elles affectent environ une personne sur un million. Elles sont dues à des mutations dans le gène *ASAH1* (N-acylsphingosine amidohydrolase-1). Les mutations dans ce gène sont à l'origine de la maladie de Farber et d'une forme rare d'amyotrophie spinale proximale avec épilepsie myoclonique progressive (AMS-EMP).

Les symptômes de l'AMS-EMP peuvent apparaître dès l'âge de 2 ans et incluent une difficulté croissante à marcher, des chutes régulières, une faiblesse musculaire et des tremblements. L'épilepsie se développe généralement à la fin de l'enfance. Au fur et à mesure que la maladie progresse, les patients ont une activité épileptique croissante, une mobilité altérée, des dysfonctionnements cognitifs, une perte auditive ainsi qu'une atrophie cérébrale et cérébelleuse.

La maladie de Farber est, quant à elle, caractérisée par de douloureuses malformations articulaires, des nodules lipomateux sous-cutanés, un enrouement vocal. Cette maladie est souvent fatale entre 2 et 3 ans. La gravité de la maladie de Farber masque probablement l'atteinte du système nerveux central qui survient plus tardivement. Des approches thérapeutiques ont été développées dans la maladie de Farber. Au vu de la similitude des symptômes neurologiques dans les deux pathologies, ces approches peuvent donc s'appliquer à l'AMS-EMP.

Le gène *ASAH1* code pour la céramidase acide (ou N-acylsphingosine amidohydrolase-1). C'est une enzyme lysosomale qui hydrolyse la céramide en sphingosine et acide gras.

Les patients atteints d'une AMS-EMP et de la maladie de Farber ont un déficit de l'activité enzymatique de la céramidase acide. Ce déficit est responsable de l'accumulation intracellulaire de céramide qui est toxique pour la cellule. Il n'existe actuellement aucun traitement pour ces deux pathologies. Le but ultime du projet est de concevoir une thérapie génique pour traiter la déficience en acide céramidase, quelle que soit la mutation dans le gène. Avant de tester cette approche directement dans un modèle murin dommageable, nous souhaitons réaliser une étude préliminaire

pour sélectionner le vecteur capable d'assurer une biodistribution et expression de la protéine dans les tissus atteints de la pathologie. Nous allons utiliser des souris C57Bl/6J pour tester *in vivo* quatre vecteurs AAV.

La stratégie d'expérimentation consiste en trois procédures :

- 1) Sélection d'un vecteur de thérapie génique chez des souris C57Bl/6J après administration par voie intraveineuse à l'âge de 30 jours.
- 2) Administration des deux vecteurs de thérapie génique sélectionnés, par voie intracérébroventriculaire chez des souris C57Bl/6J à la naissance.
- 3) Mise à mort par perfusion intracardiaque d'un fixateur à l'aide d'une pompe

Afin de prendre en compte le bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant la règle des 3 R :

Réduction : la déficience en céramidase acide affecte indifféremment les hommes et les femmes : des souris des deux sexes seront donc utilisées. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par groupe, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes) et ce, indépendamment de l'étude statistique prévue pour analyser les résultats.

Remplacement : il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude, car bien que des modèles cellulaires existent, ils ne permettent pas d'étudier des aspects importants dans le cadre d'une thérapie par AAV comme la biodistribution des vecteurs, leur innocuité et le niveau d'expression de la protéine dans les tissus en conditions physiologiques.

Raffinement : Selon nos prévisions, l'administration par voie intraveineuse des vecteurs viraux ne doit pas induire un phénotype dommageable chez les souris C57Bl/6J. Mais on ne peut pas exclure qu'une des doses testées induise des effets indésirables chez la souris. Pour cette raison des observations et des mesures de poids seront effectuées 2 fois par semaine. Nous utiliserons un système de points limites adaptés basé sur la perte de poids et sur l'état général des animaux (parésie et prostration). En cas de signe d'inconfort, les animaux seraient euthanasiés.

Concernant les prélèvements de tissus prévus en fin de procédure expérimentale, les animaux seront profondément anesthésiés avec un mélange d'anesthésique et de tranquillisant avant d'être euthanasiés.

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 140 souris.

13799 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative pour laquelle nous ne disposons pas de molécules thérapeutiques efficaces. L'objectif de ce travail vise à étudier le bénéfice thérapeutique d'un nouvel inhibiteur de la voie LIMK sur un modèle murin de la SLA. Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées porteuses du gène codant une forme mutée de l'enzyme humaine Superoxyde dismutase 1, impliquée dans la physiopathologie de SLA. Des souris mâles seront réparties aléatoirement en 2 groupes :

Groupe 1 (contrôle): 15 souris transgéniques traitées par le véhicule

Groupe 2 (expérimental): 15 souris transgéniques traitées par l'inhibiteur

Soit un total de 30 souris.

Plusieurs éléments sont mis en œuvre afin de suivre au mieux la règle des 3R :

- **Remplacement** : Ce nouvel inhibiteur développé très récemment dans le cadre des pathologies neurodégénératives montre des effets très intéressants sur des modèles cellulaires. Aujourd'hui, nous souhaitons déterminer le bénéfice thérapeutique de cet inhibiteur *in-vivo* en conduisant une étude comportementale motrice et une étude histologique sur les tissus d'intérêt ;

- **Réduction** : Sur la base d'une analyse statistique, le nombre de groupes de souris a été optimisé et le nombre d'animaux par groupe a été réduit à son maximum ;

- **Raffinement** : l'enrichissement dans les cages d'hébergement sera systématique (Sizzle Nest). Les animaux seront surveillés chaque jour de l'étude. Ils seront surveillés toutes les 30 min pendant 2h après injection de l'inhibiteur avec des critères de point d'arrêt anticipé codifié.

13800 Les cellules lymphoïdes innées (CLI) ont été récemment découvertes et jouent des fonctions très importantes et uniques dans l'immunité et l'homéostasie. Les CLI pourraient également jouer un rôle bénéfique dans la lutte contre les tumeurs solides. La compréhension des mécanismes contrôlant le développement des CLI permettrait de moduler et optimiser ce processus à des fins immuno-thérapeutiques. Dans ce but, nous souhaitons examiner le rôle intrinsèque de facteurs de transcription dans le développement des CLI, ainsi que d'autres lymphocytes jouant des fonctions similaires.

Des souris WT ou génétiquement modifiées seront irradiées de manière à éliminer leurs cellules souches hématopoïétiques, et injectées avec des cellules souches hématopoïétiques WT ou génétiquement modifiées. Ces cellules permettront de reconstituer le système immunitaire des souris. Au bout de 10 à 12 semaines de reconstitution, les souris seront euthanasiées et analysées pour le développement des CLI et autres lymphocytes. Ce projet devrait nécessiter 600 souris.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

-Remplacer : les facteurs de transcription dont nous souhaitons examiner le rôle dans le développement des CLI ont déjà été impliqués dans ce processus, ou sont prédit comme jouant des fonctions importantes par des modélisations bio-informatiques du développement des CLI. Leur rôle intrinsèque sera tout d'abord examiné *in vitro*, puis confirmé *in vivo*. Le passage *in vivo* est nécessaire pour récapituler tous les stades de développement des CLI et identifier précisément les stades nécessitant les facteurs de transcription d'intérêt.

-Réduire : Le modèle de chimères hématopoïétiques pour étudier le développement des CLI donne des résultats très robustes. Le nombre de souris nécessaires pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs est donc faible (n=5 par groupe). Des tests non-paramétriques seront utilisés pour évaluer la signification des résultats (tests de Wilcoxon ou Mann-Whitney).

-Raffiner : Les souris seront hébergées en groupes sociaux dans des cages enrichies. Tous les actes douloureux seront effectués sous anesthésie générale. Après chaque acte les souris seront réintégrées dans leurs groupes d'origine pour éviter le stress. Les souris déficientes pour le développement de CLI ne développent pas de pathologies. Les chimères hématopoïétiques de cette étude ne devraient donc pas développer de pathologies. Cependant, les souris seront suivies quotidiennement, et en cas d'apparition de signes cliniques, les souris concernées seront sorties du protocole et euthanasiées.

13801 Les syndromes progéroïdes (PSs) sont des maladies génétiques rares caractérisés par un vieillissement prématuré. Une mutation du gène LMNA (p. G608G) est à l'origine du syndrome de vieillissement prématuré dit « Progéria typique » ou Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS). Cette pathologie rare de l'enfant est extrêmement sévère et se caractérise par un retard de croissance, une ostéolyse, une lipodystrophie et une athérosclérose sévère et disséminée. LMNA permet de produire les protéines lamines A et C, deux constituants de la lamina nucléaire, un réseau de filaments intermédiaires qui tapisse la membrane nucléaire interne. La mutation p. G608G conduit à l'accumulation nucléaire d'une protéine anormale et toxique dérivée de la Lamine A, la progérine. Celle-ci induit de nombreux dysfonctionnements dans des processus nucléaires fondamentaux, conduisant à une mort cellulaire accélérée. Pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie, nous avons créé et caractérisé un modèle murin LmnaG609G/G609G qui reproduit la pathologie observée chez l'homme, tant du point de vue « clinique » que moléculaire. En effet, les souris HGPS LmnaG609G/G609G produisent la progérine par le même mécanisme que celui observé chez l'homme.

La majorité des patients atteints de Progeria décèdent à l'âge moyen de 13 ans des suites d'un infarctus du myocarde. Cependant, très peu d'études ont porté sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de l'atteinte cardiovasculaire dans ce syndrome. Notre objectif est d'utiliser la souris comme modèle pour aborder cette question majeure et réfléchir à de nouvelles approches thérapeutiques capables de ralentir l'atteinte cardiaque chez les malades. Nous nous intéressons en particulier aux cellules musculaires lisses vasculaires (SMCs) dont on sait qu'elles jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'aorte et du réseau artériel.

En effet, des travaux récents identifient la perte des SMCs induite par la progérine comme un facteur majeur déclenchant la fibrose artérielle et le décès prématuré des enfants atteints de progeria. Cependant, les processus cellulaires qui médient cet effet de la progérine restent inexplicables. Notre projet vise donc à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Nous souhaitons en particulier analyser le rôle des anomalies de la poly ADP-ribosylation (PARylation, un mécanisme de modification post-traductionnel des protéines) sur l'apparition des troubles cardiovasculaires et tester l'effet de 3 molécules modulant cette voie sur la survenue de l'atteinte vasculaire.

Le nombre total de souris qui seront utilisées est de 180 et quatre procédures seront suivies :

- Le maintien de la lignée : en effet, notre modèle murin qui présente des signes cliniques proches de ceux des patients est considéré comme un modèle génétiquement modifié avec un phénotype dommageable.

- Le traitement par voie orale : 18 animaux mutants (LmnaG609G/G609G) seront traités par voie orale avec 3 molécules différentes aux doses décrites dans les publications utilisant déjà ces molécules dans des modèles murins. Le traitement débutera sur des animaux âgés de 1 mois.

- L'échocardiographie : cet examen réalisé à 2 mois et à 4 mois après le début du traitement permettra d'évaluer l'effet des traitements sur la fonction cardiaque *in vivo*.

- Les prélèvements sanguins et tissulaires: tous les animaux (180) seront soumis à cette procédure. Les souris seront anesthésiées à l'isoflurane et une ponction sanguine intracardiaque sera réalisée. Les organes seront ensuite prélevés pour réaliser des analyses moléculaires et histologiques.

Cette étude sera réalisée dans un établissement utilisateur agréé et les souris seront manipulées et suivies par du personnel compétent. Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 22-24°C ; renouvellement d'air : 15 fois/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par petits groupes de 3 à 5 dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

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

- Remplacer : notre projet se fera dans la continuité d'une étude *in vitro*. Le passage à un modèle *in vivo* approprié est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme.

- Réduire : cette étude est une étude pilote permettant de valider l'hypothèse d'efficacité *in vivo* d'une molécule. Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence une modification significative des biomarqueurs qui seront suivis.

- Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs sont définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

13802 Les maladies cardiovasculaires représentent 17,5 millions de morts par an en 2012 (WHO), dont 7,4 millions sont dues à des problèmes au niveau des artères coronaires.

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes. Ces progrès n'ont pu être réalisés sans d'importants développements méthodologiques. Afin de poursuivre ces avancées techniques, notre projet consiste à développer des méthodes IRM, basées sur le caractère non invasif de la technique, pour analyser les systèmes biologiques dans une réelle approche intégrative en cherchant autant que possible à limiter la perturbation et l'influence de l'exploration sur le comportement du système analysé.

Plus précisément il s'agit de développer de nouvelles séquences en imagerie par RMN permettant d'obtenir *in vivo* des informations sur la fonction du cœur, dans le temps et dans l'espace et de mettre en évidence des dysfonctionnements. Celles-ci doivent aussi pouvoir s'adapter aux

nouvelles instrumentations, telles que des antennes de réception du signal dont le circuit électronique est à basse température (cryosondes). Ces antennes sont très performantes car elles limitent le bruit des images sans influencer la température de l'animal.

Ces méthodes seront développées chez la souris et devront à terme pouvoir être utilisées en routine clinique chez l'homme. L'imagerie du petit animal ne peut être remplacée et est indispensable pour développer et tester les nouvelles séquences IRM ainsi que le nouveau matériel de pointe avant un transfert à l'humain.

Ces nouvelles méthodes nécessiteront l'injection d'un agent de contraste IRM stable, biocompatible et déjà utilisé chez l'humain, agissant pour augmenter le contraste entre le sang et le myocarde.

Le nombre total d'animaux envisagé est de 12 souris saines. Afin de raffiner les conditions d'utilisation de ces animaux, ces souris seront imagées par lot de 2, dans le but d'espacer les sessions IRM. Ces animaux seront imagés par IRM avec une cryosonde plusieurs fois pour évaluer la reproductibilité du nouveau protocole d'imagerie. Douze autres souris ont déjà été imagées dans un autre centre, avec une antenne standard. La non-invasivité de l'IRM permet de réduire au maximum le nombre d'animaux, tout en permettant d'obtenir des statistiques de comparaison d'images acquises avec les différentes antennes.

Les animaux seront gardés dans des cages séparées, contenant des bâtonnets de bois à ronger, matériaux de construction de nid, maisonnette, tubes en carton, de la paille, de la nourriture et de l'eau à volonté.

Aucune pathologie ne sera développée chez ces animaux. Ils resteront donc sains. Néanmoins, si certains animaux montrent des signes cliniques de début de souffrance, ils pourront être séparés et placés dans des cages individuelles. De plus, l'administration d'un analgésique sera envisagée. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement.

13803 Les allergies sont très répandues au sein de notre société et ont été classées comme quatrième pathologie en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence des allergies est en constante augmentation. Elles constituent ainsi un vrai problème de santé publique. Coûteuses, les allergies altèrent également la qualité de vie des patients. Par ailleurs, l'allergie alimentaire, très courante et en constante augmentation (touchant jusqu'à 4% des adultes et 8% des enfants) peut évoluer vers des manifestations respiratoires plus graves à l'âge adulte : c'est ce qu'on appelle la marche atopique. Des lacunes existent sur les mécanismes de la progression de l'allergie et de son évolution au cours de la marche atopique.

L'objectif principal de ce projet est donc de déterminer si la voie de sensibilisation (orale, percutanée ou intra nasale) mais aussi d'observer si les propriétés de la protéine allergisante peuvent impacter la progression de la marche atopique.

Ce travail nous permettra de développer notre connaissance des mécanismes immunologiques impliqués dans l'allergie et d'améliorer la prise en charge des patients. La recherche dans ce domaine implique l'utilisation de modèles animaux d'allergie alimentaire et respiratoire. Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire pour étudier de façon optimale la réaction *in vivo*.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 128 souris femelles Balb/c.

Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire, remplacer ou raffiner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est en effet impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes *in vitro* ou *in silico*. Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. Ainsi, l'expérimentation animale est un élément essentiel de ce projet afin de modéliser efficacement la réponse physiologique globale du système. Cependant, chaque fois que possible, les études sur les animaux seront réduites grâce à l'utilisation de modèles *in vitro*. Le modèle animal utilisé a été soigneusement conçu et évalué pour fournir des informations pertinentes pour une application future à l'homme. Ce modèle est bien établi et possède l'avantage de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés du fait de la connaissance et de la précision des paramètres étudiés. Seul le personnel qualifié et expérimenté participera à l'expérimentation

animale. Ces exigences visent à s'assurer que les expériences seront effectuées efficacement et afin de minimiser la souffrance de l'animal. Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique et a été réduit au maximum. Les animaux seront logés dans un environnement adapté avec une humidité relative et une température contrôlée et bénéficieront d'enrichissement. Enfin, le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec évaluation quotidienne des signes généraux. Lors des procédures expérimentales, la mise en place d'analgésie et d'anesthésie mais aussi un suivi minutieux des points limites permet de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux.

13804 Le recours aux animaux à des fins scientifiques s'explique par la possibilité d'étudier un modèle de maladie semblable à la maladie développée chez l'homme et ainsi permettre de mieux comprendre le mode de fonctionnement/développement de cette pathologie. Les modèles animaux permettent également d'étudier l'innocuité et l'effet d'une molécule, ou d'une combinaison de molécules dans un organisme entier, comportant différents systèmes (sanguin, immunitaire, nerveux, hormonal...) et appareils (digestif, respiratoire, uro-génital...) qui interagissent ensembles de façon complexe à l'échelle d'un corps. Enfin, l'efficacité de thérapies innovantes peut également être testée dans des modèles expérimentaux mimant la pathologie humaine, avant de pouvoir être transféré chez l'homme.

Les primates non-humaines (PNH) comme les porcs, de par leur proximité phylogénique, leur taille, leur similitude de morphologie, de physiologie, de métabolisme et de système immunitaire avec l'homme constituent de très bons modèles pour les études dites précliniques. Ces études arrivent en dernières phases de tout projet scientifique, quand la preuve de concept a été faite dans d'autres modèles *in vitro*, *ex vivo* et/ou *in vivo* (chez d'autres espèces) en répondant à différentes questions, étapes par étapes ; ces études permettent de valider les hypothèses avant de progresser chez l'homme.

Malgré l'obtention d'autorisation de projet, il reste nécessaire parfois de réaliser en dehors et/ou en amont de protocoles autorisés des prélèvements biologiques de petits et moyens volumes/quantité (sang, salive, cellules buccales par exemple ...) pour permettre

- des test de cross-réactivité d'anticorps chez ces espèces,
- des tests fonctionnels *in vitro* de molécules innovantes sur différents types cellulaires issus de ces espèces avant d'envisager un projet *in vivo*,
- un screening des individus en amont du protocole (détermination de certains phénotypes/génotypes, étude de l'allo-réactivité immunologique entre individus),
- l'étude comparative de certains résultats d'analyse *ex vivo* d'animaux inclus dans un protocole par rapport à des témoins naïfs, non inclus dans un protocole,
- ou encore la réalisation de pools de sérums provenant de plusieurs animaux différents mais appartenant à la même espèce, difficilement accessibles dans le commerce et utilisés dans différentes techniques *in vitro* (culture cellulaire, immunohistochimie).

Cette demande d'autorisation, inclura au maximum une vingtaine de primates et une trentaine de porcs par an soit un maximum de 250 animaux pour 5 ans, animaux qui seront inclus ultérieurement (réutilisation 3R) dans un protocole de recherche autorisé. Les prélèvements réalisés concernent des procédures peu invasives (prises de sang, prélèvements buccaux, ...) et seront réalisés sous anesthésie de façon à ne pas stresser les individus. Ils pourront être réalisés à des fréquences diverses tout en respectant les limites de volumes prélevables par rapport à la volémie et au temps de récupération entre deux prélèvements. Ces procédures ne sont pas douloureuses et n'impliquent donc pas de traitement analgésique.

Il n'existe pas de remplacement possible pour l'obtention de ces échantillons biologiques animaux, cependant l'utilisation de ces animaux répond aux exigences de réduction et de raffinement.

Les primates sont hébergés en volière de façon à respecter leur mode de vie en communauté.

Les porcs, selon leur taille et leur comportement, sont hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce.

13805 Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de recherche dans le monde. En dépit des progrès de la médecine et des traitements tels l'immunothérapie impliquant les check-point inhibiteurs limitant le risque de récurrence du cancer, tous les patients ne répondent pas à ces traitements. Une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-tumorale ainsi que le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie sont donc essentielles. En effet, on sait aujourd'hui que la réponse immunitaire est essentielle pour éliminer la tumeur, que ce soit par la réponse innée (cellules NK, cellules présentatrices d'antigènes) ou par la réponse adaptative (lymphocytes T et B). Nous proposons ici, de tester *in vivo* l'effet thérapeutique d'un anticorps monoclonal ciblant une molécule humaine. L'effet anti tumorale de cet anticorps a préalablement été validé *in vitro*. Cependant, dans nos tests *in vitro*, les cellules immunitaires humaines rencontrent les cellules tumorales seulement, *in vivo* les cellules immunitaires humaines devront migrer sur le site tumoral et attaquer une structure hétérogène faite de cellules endothéliales, de fibroblastes et de cellules tumorales. Ce modèle complexe, beaucoup plus proche de la réalité clinique nous permettra d'apprécier l'efficacité préclinique de notre stratégie.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

- Remplacer : L'anticorps thérapeutique que nous souhaitons tester *in vivo* a déjà été validé *in vitro*. Cependant le passage aux modèles *in vivo* est indispensable pour définir les effets des anticorps thérapeutiques dans des contextes inflammatoires plus complexes. A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de modèle *in vitro* mimant la situation complexe que constitue le système immunitaire humain c'est pourquoi nous avons besoin d'utiliser un modèle de souris humanisées.

- Réduire : Puisqu'il n'existe pas d'autres modèles complexes pour valider l'effet des anticorps, les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est-à-dire validées avec tests statistiques). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ($n < 30$). Nombre total d'animaux = 240

- Raffiner : Les souris seront hébergées par 5 dans des cages sur portoir ventilé avec des nidifications à base de cartons et de tunnels. Les souris ont accès libre à l'eau et à la nourriture et sont maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque les cellules humaines seront injectées et les signes cliniques notables et sévères décrits dans cette saisine seront notés. Les animaux seront suivis quotidiennement et les signes cliniques seront évalués, puis lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux l'effet des molécules testées.

13806 La fièvre Q est une zoonose causée par une bactérie intracellulaire stricte appelée *Coxiella burnetii*. On trouve dans la littérature une vingtaine de cas de maladies lymphoprolifératives associées à l'infection par *C. burnetii*.

Des études menées par notre laboratoire sur des biopsies de ganglions lymphatiques provenant des patients avec le lymphome B, ont pu mettre en évidence la présence de *C. burnetii* dans ces ganglions. La présence de *C. burnetii* dans le microenvironnement lymphoïde suscite la question sur le lien éventuel entre l'infection par cette bactérie et le développement des lymphomes. La précision de ce lien chez les humains reste éthiquement discutable. L'expérimentation animale est incontournable, en effet aucune étude *in vitro* ne peut permettre d'étudier les ganglions dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques.

Notre projet consiste à mettre au point un modèle d'infection par *C. burnetii* sur des souris susceptibles à développer un lymphome B. Ce modèle permettrait d'une part d'approfondir les connaissances concernant le éventuel lien entre l'infection par *C. burnetii* et le développement des lymphomes et d'autre part de mieux caractériser les sites de prédilection (ganglions ?) lors d'une infection par *C. burnetii*.

Ce projet utilisera des souris sauvages et des souris susceptibles à développer un lymphome B.

La souris est retenue comme modèle expérimental en tenant compte du fait que la majorité des données de la littérature sur l'infection à *C. burnetii* portent sur cette espèce animale. En outre, c'est cette espèce animale qui a été utilisée pour avoir des souris sensibles à développer un lymphome. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, une étude pilote sur un effectif réduit de souris sauvages suite à l'infection par *C. burnetii* est effectuée dans un premier temps. Cette étude servira à faire un phénotypage des cellules immunes au sein des organes lymphoïdes. S'il y a des modifications secondaires suffisantes (polarisation macrophagique, modification de pourcentage de différentes populations de cellules immunes au sein des organes lymphoïdes) nous infecterons le reste des animaux sinon le protocole sera arrêté. Pour chaque étape de notre projet, nous avons utilisé un nombre minimum d'animaux qui ne permettrait d'avoir un résultat significatif. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, poumons, rate, foie et différents ganglions).

Par ailleurs, pour limiter toute souffrance et/ou angoisse des souris, nous mettons en œuvre des mesures d'acclimatation en zone d'hébergement de 10 jours avant de commencer les manipulations et les expérimentations seront menées par le même expérimentateur. Les cages sont également enrichies à l'aide des igloos et de matériel de nidification et les animaux seront suivis quotidiennement même les jours fériés et pesés chaque 3 jours pour relever tout signe d'inconfort ou d'anormalité pour intervenir le plus rapidement possible. Le suivi et les pesées seront effectués par un personnel entraîné et compétent.

Ce projet mettra en œuvre des méthodes très peu invasives (infection par aérosols et prélèvement du sang sous anesthésie générale suivie d'euthanasie puis prélèvement d'organes cibles en post-mortem). Les souris sont sensibles à l'infection à *C. burnetii*, avec infection tissulaire et apparition des lésions microscopiques notamment au niveau des poumons, foie et rate et apparition des taux élevés d'anticorps. Sur la base des expériences précédentes, il n'est pas attendu de douleur physique lors de ces expérimentations et les points limites ne sont pas atteints.

C. burnetii sera recherchée dans ces différents organes notamment au niveau des ganglions par détection moléculaire, immunomarquage de l'ADN par FISH et immunohistochimie. Les modifications au sein des ganglions seront également suivies par analyse histologique et phénotypage de différentes populations cellulaires par la cytométrie de flux.

Le projet nécessitera 100 animaux au total.

Ce projet sera réalisé dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3.

13807 A l'Hôpital, le bloc opératoire est un centre névralgique qui réunit une dizaine de professionnels de santé autour du patient. Les principaux intervenants sont l'anesthésiste, l'infirmier(e) anesthésiste (IADE), l'interne, le chirurgien et l'infirmier(e) instrumentiste (IBOD).

Les IBOD, diplômé(e)s d'Etat du bloc opératoire, exercent de nombreuses missions, avant, pendant et après l'opération, dont des activités d'aide opératoire en présence du chirurgien.

Il s'agit dans ce projet de proposer une formation professionnelle en chirurgie mini invasive pour ces personnels de bloc opératoire.

Cet enseignement est essentiellement effectué de façon théorique et par assistance vidéo.

Il est complété par des formations sur simulateur. Il a enfin une partie de formation sur l'animal pour pouvoir effectuer des manipulations en conditions réelles.

En effet, les simulateurs ne sont pas, aujourd'hui, à même de reproduire des conditions particulières telles que des saignements subits en peropératoire, des zones d'ischémie et l'ensemble des difficultés rencontrées au cours de la réalisation d'une procédure chirurgicale.

Dans le cadre de leur formation, les personnels de bloc opératoire ont également, dans le domaine de la délégation de compétences, la possibilité d'aider le chirurgien en réalisant des gestes techniques sous leur responsabilité.

L'objectif est de permettre au personnel de bloc opératoire de se familiariser, sur un modèle expérimental très proche de l'homme, aux contraintes de la chirurgie assistée par l'image.

En chirurgie viscérale, les organes ont des spécificités qui ne sont aujourd'hui pas reproduites par les simulateurs. Le porc est alors un modèle de choix pour reproduire un contexte chirurgical adapté à la taille des instruments et aux repères anatomiques utilisés en clinique.

Sur l'animal, les participants réalisent les gestes essentiels et exclusivement limités à cette possibilité de transfert de compétence, abord de la cavité péritonéale par insertion de trocart, gestes d'hémostase et de suture élémentaires, assistance opératoire. Le personnel se relaie successivement sur le même modèle expérimental pour répéter à plusieurs reprises des procédures de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux requis pour effectuer les gestes.

Pour ce projet, 60 porcs seront nécessaires sur 5 ans pour former aux techniques mini-invasives plus de 250 personnels de bloc opératoire, dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Des simulateurs et des pièces anatomiques sont utilisés au préalable pour les apprentissages élémentaires. L'animal permet seul de contrôler la vitalité et l'efficacité chirurgicale d'une procédure évoluée. Il y sera substitué chaque fois qu'un simulateur permettra de valider un apprentissage.

Réduction : Un animal est utilisé de façon prolongée par 5 personnels en moyenne, pour optimiser le nombre de procédures effectuées au cours de chaque séance. Si une même procédure peut être répétée chez le même animal au cours de la même séance, le nombre d'intervenants sera augmenté pour limiter le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Cette étude prévoit des procédures mini-invasives effectuées exclusivement sous anesthésie générale avec administration d'antalgiques, sous la supervision d'un expert chirurgien. Le sacrifice après apprentissage est effectué sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales.

13808 Le réseau de neurones ocytocines (OT) régule de nombreux comportements. Ce réseau est perturbé chez des souris déficientes pour un gène qui chez l'homme est responsable de 2 maladies rares, avec un syndrome autistique. Nous avons montré que l'administration d'ocytocine rétablit une activité de succion normale chez la souris nouveau-née et corrige les troubles du comportement autistique. Nous voulons comprendre comment ce réseau est perturbé chez les souris mutantes et comment son fonctionnement normal est restauré après une administration exogène d'OT après la naissance. Ce projet étudie comment une altération du système ocytocine entraîne des problèmes de succion et des troubles autistiques afin de déterminer les conditions optimales pour traiter les souris modèles des pathologies étudiées. C'est un projet qui a un fort impact en recherche préclinique pour traiter deux maladies rares.

Description des objectifs: Pour étudier les 2 maladies rares, nous avons généré 4 lignées de souris qui présentent des mutations similaires aux mutations humaines les plus fréquentes identifiées dans le gène. Nous générerons des animaux afin d'étudier: 1) le comportement des différentes lignées de souris mutantes et de corréler les mutations retrouvées chez les patients à ces comportements ; 2) comment le réseau de neurones OT se développe au cours du développement post-natal normal et quels sont les défauts de ce système chez les souris mutantes ; 3) comment les connexions des neurones OT aux différentes régions du cerveau se mettent en place dans le cas normal et pathologique. La compréhension de ces défauts permettra de comprendre la pathologie et donc de proposer un traitement par administration d'OT approprié, en particulier en termes de voie d'administration, de période d'administration du traitement et de dose.

Pour être conforme à la règle des 3R: Nos résultats précédents montrent l'intérêt de ces souris transgéniques mutantes, elles constituent des modèles animaux nécessaire aux études précliniques des 2 pathologies associées à ces mutations. Aujourd'hui il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation d'un modèle animal, qui peut reproduire des symptômes de la pathologie, pour mener une étude qui est indispensable pour des études précliniques. Ces souris transgéniques analysées sur trois générations présentent, pour moins de 50%, un phénotype dommageable à la naissance où elles meurent par manque d'activité de succion qui résulte d'un problème moteur. Les nouveau-nés sont gardés avec la mère dans des conditions normales et surveillés plusieurs fois

par jour, dès le jour de la naissance. Lorsqu'un nouveau-né est isolé du nid et est agonisant, il est mis à mort afin d'abréger ses souffrances.

En plus des 4 lignées de souris mutantes, nous avons aussi 4 lignées transgéniques qui seront croisées avec nos souris mutantes pour nous permettre de visualiser par fluorescence les neurones OT ou de contrôler leur activité. Un total de 2536 souris sur 4 ans sera généré (maintien de lignées et cohortes pour analyses).

Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, les souris seront évaluées sur plusieurs tests expérimentaux quand cela est possible. Les mêmes cohortes seront analysées pour leur comportement alimentaire à la naissance, et pour les différents tests de comportement social et d'apprentissage puis seront sacrifiées et les tissus seront analysés. Nous utiliserons 20 animaux par génotype et sexe pour chaque cohorte, nombre évalué par nos expériences précédentes, et conforme à la taille des cohortes analysées dans les publications pour ce type d'étude comportementale, pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les animaux testés en comportement seront sacrifiés pour des analyses de neuroanatomie ou biochimique ou de biologie moléculaire ou en électrophysiologie, le nombre d'animaux requis pour ce type d'analyse est de 6 souris par chaque sexe/ génotype. Après le sevrage, les souris seront séparées en fonction du sexe et 3-5 animaux seront hébergés par cage dans des conditions normales d'hébergement d'une animalerie de laboratoire. La température, la pression et le degré d'hygrométrie sont contrôlés. Les souris ne subissent aucune restriction hydrique ou alimentaire, aucun stress, et sont dans une cage en présence de diamond twist (fibres papier pour nidation) et de tunnel (Envigo) pour enrichir l'environnement.

Souffrance et angoisse: Les animaux sont anesthésiés sous isoflurane (ou par hypothermie pour les nouveau-nés) lors des procédures chirurgicales (injections de virus non-pathogènes par stéréotaxie) et des soins analgésiques pré et post opératoires sont donnés. Les souris opérées sont hébergées au calme dans une armoire ventilée dédiée avec un suivi quotidien post-opératoire. Dans les études neuroanatomiques nécessitant de perfuser les animaux pour fixer les tissus qui seront analysés, une anesthésie profonde est préalablement effectuée. Les mises à mort faites pour prélever des tissus post-mortem se font également après anesthésie profonde. Aucun des tests comportementaux effectués (comportement social, apprentissage) ne met l'animal en état de souffrance ou n'est douloureux, le but étant d'évaluer le comportement spontané de l'animal dans des conditions non traumatiques. Les animaux sont habitués à la manipulation par l'expérimentateur et habitués à un nouvel environnement lorsque le test comportemental se fait dans cet environnement. Étant donné que beaucoup de nos études nécessite l'identification et le génotypage des nouveau-nés, il est important d'utiliser la méthode la plus appropriée lorsque dans une portée les individus peuvent présenter des génotypes différents. La biopsie de la phalange distale consiste en l'ablation de la phalange distale d'un nouveau-né, qui est ensuite utilisée comme source d'ADN. Cette méthode fournit également un moyen d'identification. Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement dans tous les cas par un aspect physique : plaies, état du poil, grosseurs anormales, maigreur et un aspect comportemental: apathie, stress, sommeil, interactions, agressivité, nidation. Ce suivi est effectué par un zootechnicien et/ou l'expérimentateur de l'équipe de recherche qui notent toutes les observations faites et les actions entreprises.

13809

La mort irréversible des cellules neuronales rétinienne est une des complications des maladies de l'œil comme le glaucome ou l'uvéite et entraîne une perte de la vision. Bien que des traitements existent pour réduire les causes de ces maladies, aucun traitement n'existe pour protéger les cellules neuronales et plus particulièrement les photorécepteurs, indispensable pour la vision. Depuis de nombreuses années, notre laboratoire recherche et teste des molécules thérapeutiques pour préserver les photorécepteurs au cours des maladies neurodégénératives de la rétine, comme la dégénérescence maculaire lié à l'âge ou la rétinopathie diabétique. Notre projet est d'étudier des molécules thérapeutiques pour préserver la rétine au cours du glaucome et de l'uvéite.

Nous testerons les molécules thérapeutiques découvertes au laboratoire et ayant déjà montré leur efficacité dans des modèles animaux et chez l'homme contre la mort des photorécepteurs au cours

de diverses pathologies/modèles de dégénérescence maculaire liée à l'âge (humide ou sèche) ou de rétinopathie diabétique, dans deux autres modèles de maladies oculaires : le glaucome et l'uvéite.

Le glaucome touche plus de 2% de la population au-delà de 45 ans et est caractérisé par l'augmentation de la pression intra-oculaire, entraînant la destruction progressive et irréversible du nerf optique, une perte des cellules ganglionnaires rétiniennes, puis des autres neurones de la rétine. Le glaucome provoque une détérioration progressive du champ visuel pouvant aller jusqu'à la cécité en l'absence de traitement efficace. L'uvéite est une inflammation à l'intérieur de l'œil dont l'origine est soit une infection soit une maladie inflammatoire et qui est une cause fréquente de perte de vision chez l'adulte. Dans ces deux pathologies, les traitements consistent à réduire les causes mais ne permettent pas de protéger les cellules neuronales extrêmement sensibles à toute modification de leur environnement comme c'est le cas dans ces maladies. Ainsi, cette étude va nous permettre de révéler une/des molécule(s) neuroprotectrice(s) qui pourront être utilisée(s) comme complément aux traitements déjà existants pour préserver la vision des patients.

L'utilisation des animaux est essentielle car l'œil est un organe complexe composé essentiellement de neurones dont la culture cellulaire est extrêmement difficile et dont les interactions avec l'ensemble des autres cellules de l'œil mais également des autres organes ne peuvent être remplacées. Nous utiliserons au total 1720 rats. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux utilisés par des stratégies de remplacement et de réduction. Nous mettrons au point un nouveau modèle de glaucome pour réduire le temps de l'étude sur les individus. Nous utiliserons des examens *in vivo* pour permettre d'évaluer la progression de la maladie et les nouveaux traitements sur un même animal réduisant le nombre d'animaux. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et locale et une veille de la douleur sera effectuée au réveil et cette dernière traitée par des antalgiques adaptés

13810 La cornée est le tissu le plus densément innervé de l'organisme. Les nerfs cornéens assurent la sensibilité proprioceptive (sensation de toucher) et nociceptive (sensation de douleur et de variation de température) et jouent un rôle important dans le réflexe de clignement, de production de larmes et de cicatrisation cornéenne.

De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre la dysfonction de l'innervation cornéenne et l'apparition d'atteintes cornéennes. Ces atteintes vont de la simple sécheresse oculaire jusqu'à des pathologies cécitantes comme la kératite neurotrophique. Environ 285 millions de personnes dans le monde souffrent de déficience visuelle sévère, dont 10% liée à une atteinte cornéenne. De même, parmi les 40 millions personnes aveugles dans le monde, plus de 1.5 millions sont atteints de pathologies cornéennes. L'atteinte de l'innervation cornéenne est fréquemment responsable des pathologies cornéennes entraînant une baisse importante d'acuité visuelle. Ces atteintes peuvent être secondaires à de nombreuses pathologies infectieuses ou inflammatoires de la cornée. Aucun traitement n'est actuellement disponible en routine malgré le nombre important de patients concernés.

Dans ce projet, nous étudierons l'effet d'une molécule pharmacologique sur la régénération des axones cornéens sur un modèle murin de kératite neurotrophique. Au total, 116 souris seront utilisées dans ce projet. L'utilisation de l'animal est indispensable dans le projet car il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de suivre les mécanismes de régénération de l'innervation cornéenne. Ce modèle est obtenu par lésion des nerfs cornéens sous anesthésie générale et la cornée sera en plus anesthésiée localement. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, des bâtons à ronger, un tunnel et une maisonnette. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

13811 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cinquième cancer le plus répandu et la quatrième cause de mortalité liée au cancer avec 850 000 décès en 2018. Le CHC est un cancer présentant des

réponses inflammatoires diverses, responsables des échecs de nombreuses thérapies actuelles. Parmi ces facteurs inflammatoires, nous avons identifié au sein de notre laboratoire un facteur inflammatoire appelé l'interleukine-17 (IL-17) pouvant avoir un rôle dans la progression tumorale et contribuant aux échecs thérapeutiques mais dont les mécanismes d'action nécessitent d'être précisés. En effet, dans ce contexte, nous avons montré *in vitro* que l'IL-17 induit l'expression de la protéine « Programmed death ligand 1 » (PD-L1) bien connue pour son rôle protumorale dans plusieurs types de cancers. Par ailleurs, l'IL-17 favorise l'angiogenèse, un processus qui permet de créer de nouveaux vaisseaux nécessaires à la croissance de la tumeur en l'approvisionnant en nutriments et en oxygène.

Ceci nous a donc conduit à émettre l'hypothèse qu'une thérapie neutralisant l'IL-17 à l'aide d'anticorps permettrait de réduire à la fois l'angiogenèse et l'expression de PD-L1 et par conséquent, réduirait la croissance de la tumeur. Pour valider cette nouvelle stratégie thérapeutique, nous proposons de réaliser l'étude dans un modèle murin de CHC induit par une injection d'un agent carcinogène, le diethylnitrosamine (DEN), à des souriceaux de 2 semaines. Ces souris développent ensuite des tumeurs 8 mois plus tard. L'administration d'un deuxième agent toxique, le tétrachlorure de carbone (CCI4) permettra d'induire une inflammation et une fibrose du foie afin de mimer les complications observées chez l'homme.

Dans cette étude un nombre total de 376 souris sauvages et déficientes en IL-17 seront utilisées.

Règle des 3Rs (Réduire, Remplacer, Raffiner) :

1/ Remplacer les animaux :

Les effets de l'IL-17 ont été étudiés *in vitro*. Il est indispensable de réaliser une étude *in vivo* en complément des expérimentations *in vitro* dans le but de reconstituer le micro-environnement tumoral complet composé d'un environnement immunitaire et d'un réseau vasculaire.

2/ Pour réduire le nombre de souris utilisées :

La première procédure sera réalisée sur un nombre d'individu de 52 souris mâles et permettra d'étudier *in vivo*, l'implication de l'IL-17 dans la progression tumorale.

Le nombre d'animaux à inclure par groupe a été calculé à l'aide d'un calculateur d'échantillons afin d'obtenir des effets significatifs tout en limitant le nombre d'animaux au strict minimum.

3/ Raffiner les méthodes : L'âge de 8 mois permet un développement tumoral suffisant à l'étude sans avoir de signes de souffrance liés au cancer asymptomatique jusqu'au stade tardif de la maladie. De plus les doses des molécules administrées ont été déterminées sur de précédentes études publiées où aucun signe néfaste pour l'animal n'a été décrit.

Après l'injection de DEN, les souriceaux seront immédiatement replacés dans les cages d'accouplement auprès de leurs parents afin d'éviter tout stress supplémentaire. Les animaux seront ensuite hébergés par groupe de 5 souris maximum par cage avec enrichissement (tubes et maisons en carton) avec de l'eau et nourriture ad libitum. Si un comportement anormal des souris est observé (posture, position des oreilles, fermeture de l'œil) elles seront mises à mort.

Le but général de ce projet est de déterminer *in vivo* l'efficacité d'une neutralisation de l'IL-17 sur la progression du CHC, dans la perspective de développer de nouvelles thérapies.

13812 Le projet présenté vise à mettre au point des méthodes permettant d'étudier la localisation des nanoparticules dans les lysosomes et les dysfonctions associées dans le poumon, et à évaluer la reproductibilité de ces méthodes. Ces méthodes sont nécessaires pour réaliser un projet du laboratoire qui vise à évaluer le rôle de la chimie de surface dans l'incorporation des NPs dans les lysosomes et les perturbations de la fonction lysosomale qui en découle, dans le poumon, en comparant les effets de 8 NPs de chimie de surface différente, ceci, afin d'évaluer les risques sanitaires respiratoires encourus par les travailleurs de l'industrie et la population générale suite au développement des nanotechnologies. Pour mettre au point les méthodes d'étude du lysosome, des souris recevront une administration pulmonaire d'une NP de référence ou de sérum physiologique, puis les lavages broncho-alvéolaires et les poumons de ces souris seront prélevés

afin d'étudier la localisation lysosomale de la particule et la dysfonction lysosomale induite par cette NP. Ce travail nécessitera au maximum 362 souris sur une période de 3 ans.

Respect de la règle des 3R:

Remplacement: Face au nombre croissant de NPs développées ou présentes sur le marché, le recours à des essais toxicologiques *in vitro* est fortement encouragé par l'Union Européenne, comme cela est déjà le cas pour les substances chimiques non particulaires. Toutefois, l'utilité de ces essais reste discutée, car les modèles cellulaires qu'ils utilisent ne sont pas représentatifs de l'architecture des organes qu'ils sont sensés mimer, ni de l'organisme entier. De plus, dans le cas précis de notre projet, il n'existe aucun modèle *in vitro* validé permettant de mimer les pathologies respiratoires que les NPs sont susceptibles d'induire ou de moduler, comme l'asthme.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les expériences seront réalisées par une seule et même personne expérimentée, suivant des protocoles standardisés, afin de garantir une bonne reproductibilité des expériences permettant de réduire le nombre d'animaux par groupe. Quand possible, plusieurs méthodes d'étude du lysosome seront mises au point à partir des mêmes prélèvements. Un des objectifs du présent projet est de déterminer, parmi les différentes méthodes d'étude du lysosome décrites dans la littérature, quelles sont celles les plus adaptées à notre projet, afin de ne garder, dans notre futur projet comparatif sur 8 NPs, que les méthodes les plus pertinentes, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. Un autre objectif du projet est d'évaluer la reproductibilité des méthodes qui seront développées afin de n'utiliser, dans notre projet final, que le nombre strictement nécessaire d'animaux.

Raffinement : Des carrés de ouate de cellulose (nestlets), qui stimulent l'instinct de déchiquetage et de construction de nids des rongeurs, seront utilisés pour enrichir le milieu des animaux. Les procédures expérimentales seront mises en oeuvre de telle sorte à réduire au maximum le stress, l'inconfort et la souffrance. Les administrations de NPs seront réalisées sous anesthésie afin d'immobiliser et de tranquilliser l'animal et de palier une douleur. En cas de souffrance, l'animal concerné fera l'objet d'un suivi intensifié. En dernier recours, il sera mis à mort sur la base de points limites adaptés.

13813 Les lymphocytes T CD4 ont pour fonction d'orchestrer la réponse immunitaire adaptative. Plusieurs types de Lymphocytes T CD4 coexistent dans l'organisme :

- Les Lymphocytes T CD4 dits effecteurs dirigent l'orientation des réponses immunitaires dans le but d'éradiquer les agents pathogènes.
- Les Lymphocytes T CD4 dits régulateurs ont un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire et la prévention des maladies auto-immunes.
- Les Lymphocytes T CD4 dits naïfs, majoritaires, ont la capacité de se transformer en Lymphocytes T CD4 effecteurs ou régulateurs. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes régissant la transformation des Lymphocytes T CD4 naïfs en Lymphocytes T CD4 effecteurs ou régulateurs.

Cette transformation dépend de l'activité de molécules spécifiques. Par des expériences menées *in vitro*, nous avons identifié certaines de ces molécules et souhaitons maintenant valider définitivement nos découvertes, *in vivo*, chez la souris.

Pour cela, nous souhaitons administrer aux animaux des molécules inhibitrices ciblant les molécules que nous avons identifiées comme importantes lors de cette transformation. Les molécules que nous ciblerons sont toutes impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, ceci à différents niveaux. Nous aurons donc la possibilité de moduler ces phénomènes et de valider dans un contexte physiologique les résultats que nous avons obtenus *in vitro*.

Les molécules inhibitrices que nous utiliserons ont pour la plupart d'entre elles déjà été utilisées en clinique et sont connues pour ne pas induire d'effets délétères chez les animaux.

Deux modes d'administration de molécules inhibitrices seront utilisés en fonction des caractéristiques de ces molécules : injection par voie intra-péritonéale et administration de molécules par implantation de pompes osmotiques. Ces molécules pouvant induire un changement

des caractéristiques des cellules que nous souhaitons étudier, nous injecterons chez une partie des animaux, des Lymphocytes T CD4 de phénotype connu (que nous pourrions identifier par la suite) avant de leur administrer ses inhibiteurs. Cette injection (ou transfert adoptif) se fera par voie intraveineuse.

Enfin, en conformité avec les exigences 3R :

- Des lots d'un nombre réduit d'animaux seront utilisés en anticipant la validité statistique des données obtenues (réduction).
- Des expériences préliminaires réalisées sur des nombres réduits d'animaux seront mises en œuvre de façon à affiner les protocoles utilisés par la suite.
- Des modèles expérimentaux non invasifs seront favorisés.
- Des points limite appropriés ont été définis et permettront de mettre fin à l'expérimentation de manière anticipée.
- Des mesures visant à réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux seront prises (Raffinement). Ainsi, l'implantation de pompes osmotiques se fera sous anesthésie et les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet. Enfin, ils recevront des antalgiques en pré- et post-opératoire (pendant 24h) lors de l'implantation de ces pompes osmotiques.

Un suivi attentif des animaux est prévu pour chaque procédure. Un traitement antalgique préventif et curatif sera mis en place pour les procédures susceptibles d'induire une douleur.

Le nombre total d'animaux est estimé à 1386 souris pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur cinq ans. Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient apporter une meilleure compréhension des mécanismes de génération de cellules T CD4 régulatrices *in vivo* et conduire également vers de nouvelles stratégies d'immunothérapie et de traitement de maladies auto-immunes.

13814 Il a été identifié que la protéine X jouait un rôle important dans la formation de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux existants, un processus physiologique normal dans le développement du réseau vasculaire mais qui est également impliqué dans un certain nombre de pathologies (vascularisation tumorale et dissémination métastatique lors des cancers, dégénérescence maculaire liée à l'âge, ou dans certaines maladies génétiques).

Une équipe collaboratrice s'intéressant à l'implication de la protéine X dans le développement de ces désordres vasculaires a développé des souris X KO et a montré que ces souris présentaient un phénotype proche de la maladie de Rendu-Osler avec de nombreux désordres vasculaires dans la plupart des organes (cerveau, foie, rate, rein, intestin, utérus).

L'objet du présent projet est d'utiliser différentes techniques d'imagerie *in vivo* (imagerie SWIR (Short-Wave Infrared) et photoacoustique) pour explorer le phénotype de ces animaux et effectuer un suivi au cours du temps de la progression des caractères observés avec l'âge des animaux.

Pour obtenir les résultats escomptés pour chaque type d'imagerie, un total de 140 souris sera nécessaire.

Remplacer :

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour la compréhension de la pathologie humaine et l'élaboration ultérieure de stratégies thérapeutiques. Le recours à des investigations *in vivo* chez l'animal est donc nécessaire.

Réduire :

L'utilisation de l'imagerie pour la caractérisation de ces animaux vise justement à éviter un grand nombre d'animaux sacrifiés pour étudier la progression des anomalies liées à l'avancée en âge.

Raffiner :

Toutes les procédures seront conduites sous anesthésie gazeuse avec une gestion de la douleur adaptée à chaque situation.

13815 Dans le cadre d'un projet visant à étudier la croissance de deux lots de 12 veaux Holstein soumis à des régimes nutritionnels différenciés, nous souhaitons utiliser les techniques d'imagerie non invasives de tomographie rayons X et d'IRM comme techniques de référence en complément des mesures morphométriques et échographiques qui auront lieu en élevage.

Les objectifs des examens tomographiques seront la mesure de la densité osseuse et le suivi qualitatif et quantitatif du développement des estomacs (rumen, réseau, feuillet et caillette). L'objectif des examens IRM seront la mesure du volume du parenchyme mammaire.

Le choix de ces deux techniques est basé sur des essais préliminaires qui se sont avérés positifs.

Réduction : Les examens tomographique et IRM seront réalisés sur 24 veaux (2 lots de 12 veaux) car ce nombre d'animaux est statistiquement suffisant pour mettre en évidence les différences attendues.

Raffinement : Les génisses laitières utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne, hébergées ensemble en aire paillée et nourries suivant un plan de lactation / nutrition précis nécessitant une surveillance quotidienne.

Pendant toute la durée de l'expérimentation, les animaux auront accès à de la paille fraîche (distribuée quotidiennement) et à de l'eau de façon ad libitum.

Les examens auront lieu sur des veaux âgés de 12-13 semaines pour éviter de perturber les animaux pendant la période critique qui suit immédiatement le sevrage à 9 semaines puis une deuxième fois à 18-19 semaines. Les animaux subiront un examen tomographique de courte durée dans un premier temps (de l'ordre de 15 minutes) puis un examen IRM (limité à 1 heure) afin de limiter les perturbations de la durée de l'anesthésie sur les animaux. Le réveil des animaux aura lieu au calme dans une case capitonnée, dans une salle chauffée. Après le réveil effectif, le veau sera ramené dans son environnement en élevage.

Remplacement : Très peu de données sont disponibles aujourd'hui sur la variation des indicateurs phénotypiques permettant de suivre la croissance des veaux de la naissance à la puberté. En outre, cette étude va nous permettre de générer des données qui n'existent pas à l'heure actuelle sur la croissance des pré-estomacs et de la glande mammaire de la génisse laitière par des méthodes d'imagerie non invasives. Enfin, il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle mathématique prédictif qui nous permettrait de suivre la croissance des veaux, cette expérimentation ne peut donc pas être remplacée.

13816 Amendements:

1°) Depuis le dépôt du projet de nouveaux vecteurs viraux ont été développés pouvant être administrés par voie intramusculaire ce qui serait bénéfique pour l'animal. Une procédure est ajoutée pour tester ces nouveaux vecteurs afin d'en identifier un qui permettrait de modifier les propriétés des motoneurones par une simple injection intramusculaire. Ce test nécessite d'augmenter le nombre total de souris du projet qui passerait de 720 à 760.

2°) Changement de la molécule testée dans la procédure 3, en fonction du résultat de tests en cours effectués dans un autre laboratoire avec lequel nous collaborons.

3°) Une des molécules anesthésiantes utilisées dans la procédure 4 n'est plus disponible, le protocole d'anesthésie est donc modifié.

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), appelée aussi Maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative touchant spécifiquement des neurones, appelés motoneurones, qui innervent les muscles. La maladie se déclare à l'âge adulte, elle provoque la paralysie du patient et son issue est fatale. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. La découverte d'un lien génétique chez certains patients a permis de développer plusieurs modèles murins de la SLA. S'il est clair que l'introduction d'un gène humain muté dans ces animaux provoque la maladie, les mécanismes conduisant à la dégénérescence spécifique des motoneurones restent quant à eux inconnus.

Il a toutefois été montré que la dégénérescence des motoneurones est due à des interactions complexes avec les muscles mais aussi avec plusieurs types cellulaires (neurones, cellules gliales)

dans le système nerveux. Il est donc primordial d'étudier les motoneurones *in vivo* sur l'animal, c'est à dire dans leur environnement normal, plutôt qu'en culture *in vitro*.

Des découvertes récentes indiquent que les motoneurones présentent des changements de leurs propriétés électriques avant le début de la dégénérescence. Le but de ce projet est de déterminer si la restauration des propriétés électriques des motoneurones permet de ralentir l'évolution de la maladie.

Pour cela les propriétés électriques des motoneurones seront modifiées, soit à l'aide de vecteurs viraux, soit à l'aide d'un agent pharmacologique. Le schéma expérimental de ce projet permettra de déterminer si ces traitements ralentissent la survenue de marqueurs moléculaires de la dégénérescence des motoneurones. Comme la SLA est induite par diverses mutations touchant des gènes différents, il est important de réaliser ce projet sur deux modèles murins différents de la SLA. Cela permettra de vérifier que les résultats obtenus ont une valeur générale. Les procédures seront réalisées sur des animaux adultes avant le début de la dégénérescence des motoneurones et avant l'apparition des symptômes. Au total, le nombre de souris utilisées sera de 720 sur une durée de 5 ans. Cet effectif est nécessaire pour permettre des comparaisons statistiquement valides.

Les procédures utilisées dans ce projet permettent d'obtenir le plus d'informations possibles sur chaque animal utilisé. Elles permettront de réduire le nombre d'animaux utilisé au minimum. Afin d'abolir la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les injections de virus et l'étude des propriétés électriques des motoneurones se feront sous anesthésie générale. De plus une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes physiopathologiques qui aboutissent à la dégénérescence des motoneurones dans le SLA. Ils pourraient déboucher sur une solution thérapeutique innovante pour augmenter de façon significative la survie et la qualité de vie des patients atteints de SLA.

13817 L'obésité est devenue une des principales causes de morbidité dans les pays industrialisés et est devenue un enjeu grandissant de santé publique. Des facteurs génétiques et environnementaux jouent un rôle dans le développement de l'obésité. Le régime alimentaire est l'un des principaux facteurs qui contribue à cette maladie. Des études chez l'homme ont montré qu'une augmentation de la prise de graisse est associée à un gain de poids corporel qui peut mener à l'obésité et d'autres maladies métaboliques associées (résistance à l'insuline, dyslipidémie et diabète de type 2). La résistance à l'insuline et l'obésité sont principalement responsables du diabète de type 2. Actuellement aucune stratégie n'existe pour prévenir ou guérir le diabète de type 2. La Fédération de Diabète Internationale a évalué à 382 millions le nombre de patients diabétiques en 2013 (la majorité entre 40 et 59 ans). L'enjeu est d'identifier les mécanismes physiologiques de l'obésité et des maladies associées dont le diabète, afin d'en déduire les stratégies thérapeutiques les plus efficaces pour freiner, voire stopper la progression de ces pathologies.

Pour ce projet, nous alimentons les souris et les rats avec un régime riche en graisse afin d'induire une obésité et un syndrome métabolique. Pour nos clients, nous préparons les animaux qui serviront dans leurs projets de recherche. A leur demande, nous pouvons réaliser un test de tolérance à l'insuline avant d'expédier les animaux chez le client.

Ne pouvant étudier les conséquences d'un régime riche en graisse dans un système de culture cellulaire, les modèles animaux rongeurs sont un outil indispensable à l'étude des mécanismes impliqués dans l'obésité par leur facile prise de poids lorsqu'ils sont nourris avec un régime riche en matières grasses. Ils fournissent une base expérimentale à des stratégies thérapeutiques. La règle des 3R s'applique ici pour les principes de réduction et de raffinement. Nous faisons le protocole alimentaire à la demande de nos clients. Le nombre d'animaux estimé par an est calculé sur la base des demandes clients de l'année antérieure, et est de 3000 souris par an, soit 15000 souris sur 5 ans et de 300 rats par an, soit 1500 rats sur 5 ans. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (bâton de bois à ronger). Les points limites sont observés tout

au long du projet. Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

13818 Des analyses que nous avons menées *in vitro* sur des cellules cancéreuses ont montré que différentes conditions de culture cellulaire peuvent induire un phénomène de dormance cellulaire, c'est à dire un arrêt stable mais réversible des divisions cellulaires. Cet état dormant confère une résistance à de multiples agents anticancéreux. D'un autre côté, plusieurs modèles expérimentaux suggèrent que le phénomène de dormance limite fortement le développement des tumeurs secondaires en bloquant la prolifération des cellules cancéreuses initiatrices de tumeur. L'objet du présent projet est d'utiliser un modèle de greffe sous-cutanée de cellules de cancer du pancréas murines dans des souris C57Bl/6 pour étudier si différentes drogues ciblant le phénomène dormance ont une action d'une part sur la résistance aux agents anticancéreux et d'autre part sur la croissance tumorale. Ces analyses seront complétées par des tests *ex vivo* à partir des cellules tumorales prélevées après sacrifice de l'animal.

Ce projet s'inscrit dans un respect strict de la règle des 3R. Nous avons précédemment mené notre travail *in vitro* sur des cultures cellulaires afin de limiter le nombre des animaux. Dans ce projet, la première expérience visera à déterminer les conditions optimales pour les analyses suivantes. Ce projet nécessitera 540 souris pour une série de 5 expériences, ces valeurs pouvant être revues à la baisse en fonction des résultats obtenus. Nous limiterons au maximum la douleur et la souffrance des animaux en utilisant des modèles de greffe sous-cutanée qui permettent une grande facilité d'exécution et d'analyse. Ainsi le développement tumoral sera suivi par simple mesure externe du volume tumoral avec un pied à coulisse de précision. Plus généralement, il est important de noter qu'aucun geste invasif ou traumatisant ne sera réalisé sur des animaux vivants. Enfin des points limites stricts ont été établis (volume tumoral n'excédant pas 1 cm³, signes de dégradation de l'état de santé ou de souffrance conduisant à une mise à mort anticipée). Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé en parallèle aux mesures de croissance tumorale et du poids des animaux une fois par semaine. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber le comportement naturel de nos souris.

A terme, le but de ce projet est de pouvoir proposer de nouvelles stratégies de chimiothérapies anticancéreuses qui ne prennent pas en compte actuellement la dormance cellulaire, ce qui conduit à une fréquence élevée de récurrence locale ou métastatique. Elles pourraient grandement améliorer le pronostic très sombre du cancer du pancréas mais aussi d'autres types de cancers qui sont d'emblée, ou deviennent à terme, résistants à toute chimiothérapie

13819 Le cerveau des primates, incluant l'Homme comme les singes, leur permet de vivre en société, ce qui participe à la survie de leur espèce. Notre cerveau de primate est notamment adapté pour la perception des individus et pour l'analyse de leurs comportements. Or la cognition sociale est la première à être touchée dans de nombreux troubles neurologiques et psychiatriques, et nous ne connaissons pas exactement l'origine de ces problèmes, notamment du fait de notre connaissance insuffisante des mécanismes cérébraux qui nous permettent de percevoir et de comprendre les autres. L'objectif de ce projet est de comprendre par quels mécanismes le cerveau des primates non-humains leur permet de percevoir et de comprendre leur groupe social. Nous savons par exemple, que les singes, tout comme les humains, possèdent dans leur cerveau des régions spécialisées pour la perception des visages par rapport à d'autres objets visuels, ou encore des régions spécialisées pour la perception des voix par rapport à d'autres sons de l'environnement. Cependant nous ne savons pas 1/ par quels mécanismes biologiques, les neurones –c'est-à-dire les cellules de ces régions cérébrales– codent les individus et leurs caractéristiques sociales (comme leur genre, leur statut de dominance, leurs liens de parenté) ? 2/ comment les neurones associent-ils une même caractéristique sociale (de dominances, de genre, de parenté, d'identité) obtenue à partir de différentes modalités sensorielles, afin de coder un concept qui ne dépend plus d'une modalité sensorielle unique ? 3/ enfin, existe-t-il des régions cérébrales spécifiques aux

odeurs sociales et au toucher social, deux modalités très importantes depuis le plus jeune âge pour percevoir les autres, de la même façon qu'il existe des régions spécifiques aux voix et aux visages. Par ailleurs, les primates sont des spécialistes pour l'analyse des comportements de leurs congénères et possèdent des régions cérébrales spécifiques pour l'analyse des actions sociales, telles les interactions sociales, d'une part et des actions non-sociales, telles les manipulations d'objets, d'autre part. Cependant, nous ne savons ni 1/ par quels mécanismes les neurones extraient des informations sur les individus à partir de l'observation de leurs interactions sociales ; ni 2/ par quels mécanismes les neurones extraient des informations à propos des actions réalisées par les individus lorsque ceux-ci manipulent des objets de leur environnement. Dans ce projet, nous proposons de répondre à ces questions majeures pour les neurosciences, la psychologie sociale ou encore la biologie évolutive en utilisant des techniques d'étude du cerveau à plusieurs niveaux en alliant des méthodes exploratoires d'imagerie du cerveau afin d'identifier les régions cérébrales responsables de ces processus sociaux, à des méthodes fines d'enregistrement de l'activité des neurones et de manipulations moléculaires, afin de découvrir le code neuronal et ses modulations donnant naissance à la perception et la cognition sociale chez les primates. En combinant ces différents niveaux d'étude, nous visons à acquérir une compréhension neurale de la manière dont les catégories et les habitudes sociales sont représentées, avec l'objectif à long terme de fournir aux neurosciences cliniques de nouvelles hypothèses pour comprendre comment ces mécanismes peuvent être perturbés dans la maladie psychiatrique ou neurologique.

Sur 5 ans, nous utiliserons un total de 8 macaques rhésus et 6 singes saïmiris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement : l'anesthésie et l'analgésie sont utilisées pour réduire les douleurs possibles et les procédures comprennent des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement : les études *in vitro*, sur animaux invertébrés ou autres vertébrés, sur patients humains ne permettent pas l'étude de comportements sociaux typiques de l'humain et des autres primates ; les singes rhésus et saïmiris sont donc parmi les espèces primates les plus appropriées pour ce type d'étude.

13820 Les leucémies aigües sont un cancer des cellules du sang, caractérisées par l'impossibilité de former des cellules sanguines matures fonctionnelles. Elles présentent une hétérogénéité cellulaire avec notamment des cellules souches leucémiques, initiatrices des leucémies, qui résistent aux chimiothérapies et sont responsables des rechutes après traitement qui font la gravité de ces affections. Un élément capital de l'ancrage de ces cellules dans la moelle osseuse est le récepteur CXCR4. L'objectif de notre projet est de tester une stratégie thérapeutique originale de modification des interactions cellules leucémiques humaines/cellules du microenvironnement de la moelle osseuse, en utilisant des nanobodies (anticorps de camélidés, stables et peu immunogènes) dirigés contre CXCR4.

Règle des 3R :

Remplacement : le développement leucémique ne peut être modélisé *in vitro* car les cellules initiatrices des leucémies ne sont identifiables que sur des critères fonctionnels (agressivité) et non morphologiques. Ce projet nécessite donc l'utilisation de modèles animaux.

Réduction : le modèle murin est très utilisé dans le domaine des leucémies et bien documenté dans la littérature. Ceci évite l'utilisation d'un nombre important d'animaux dans des expériences de mise au point. Nous disposons également d'un outil d'analyse permettant un suivi longitudinal de la leucémie pour chaque souris, nous permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux requis. De plus, nous avons choisi de ne pas faire d'étude de la survie, ce qui permet de limiter la durée d'expérimentation.

Enfin, les expériences permettant de s'assurer de l'efficacité d'inhibition spécifique de CXCR4 du nanobody dans le modèle cellulaire leucémique choisi ont été réalisées *in vitro* au préalable.

Raffinement : Les animaux seront maintenus en cages stériles sur portoirs ventilés, avec nourriture et eau à volonté, en présence d'enrichissement dans la cage (sopalin ou cabane plastique).

Les animaux seront suivis quotidiennement, et sacrifiés au cours ou au terme de l'expérimentation, respectivement pour raisons sanitaires dès l'apparition des signes cliniques de développement leucémique, et/ou pour analyser la présence d'une leucémie résiduelle dans des organes non prélevables sur animaux vigiles (rate et moelle osseuse).

Ce projet nécessitera l'utilisation de 407 (nombre théorique) à 456 souris (+12% du nombre théorique, en cas de décès non lié à l'expérimentation).

Ces travaux doivent nous permettre de déterminer le potentiel thérapeutique en cancérologie de nanobodies anti-CXCR4 et pourraient permettre l'ouverture de pistes thérapeutiques originales dans les leucémies aiguës, en ciblant les interactions entre les constituants du microenvironnement de la moelle osseuse et les cellules souches cancéreuses, de manière à les sensibiliser aux chimiothérapies.

13821 Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives qui ont la particularité d'être transmissibles. Elles sont dues à une accumulation dans le cerveau d'une protéine mal conformée, la protéine prion. Chez les animaux, elles peuvent se développer chez les petits ruminants et sont connues sous la forme de tremblante naturelle, et chez les cervidés sous la forme de maladie du dépérissement chronique, la transmission se faisant entre individus majoritairement par voie oronasale. L'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB, ou maladie de la vache folle) est responsable chez l'Homme de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ), vraisemblablement par consommation de produits alimentaires contaminés. Par ailleurs, durant les dernières décennies plusieurs cas de transmission inter-humaine lors d'actes médicaux ou chirurgicaux des maladies à prions humaines ont été rapportés, liés à l'utilisation de produits contaminés) ou de dispositifs médico-chirurgicaux contaminés et traités par la suite de façon inappropriée. En effet, les prions présentent des spectres de résistance très étendus et ils sont résistants à la plupart des méthodes d'inactivation classiquement utilisées vis-à-vis des agents infectieux conventionnels.

En France, la Direction Générale de la Santé a publié plusieurs circulaires et instructions régissant le traitement de reconditionnement après utilisation des dispositifs médicaux et chirurgicaux vis-à-vis du risque lié aux prions. Cependant, ces revendications doivent se faire sur la base d'études d'efficacité réalisées selon un « protocole standard prion », ou PSP, imposé par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), tel que défini en 2011 et revu en 2018. Ce protocole requiert que « l'évaluation de l'efficacité du produit ou du procédé repose sur deux études *in vivo* conduites pour l'une avec le modèle de référence, le couple hamster infecté par la souche 263K et pour l'autre sur un couple « souche humaine/animal ». Le PSP définit également le cadre méthodologique à appliquer. Ces études permettent d'évaluer l'efficacité du procédé ou du produit par rapport à celles de traitements comparateurs sous la forme d'un facteur de réduction de l'infectiosité ». A compter du 15 mai 2021, seuls les produits ayant démontré leur conformité au PSP version 2018 seront réputés inactivants, et les solutions utilisées actuellement mais non réévaluées seront caduques.

Les études *in vivo* requises par le PSP reposent sur la modélisation expérimentale de la contamination des instruments médicaux (fines tiges en acier inoxydable de qualité chirurgicale), qui sont alors traitées avec le produit ou le procédé à tester puis implantées chez les animaux. La période d'incubation des maladies à prion étant inversement proportionnelle à la charge infectieuse administrée initialement, la survie des différents groupes sera comparée à celle de groupes exposés à une gamme de référence, ce qui permettra d'évaluer l'efficacité des procédés ou produits (par détermination d'un facteur de réduction de la charge infectieuse). De telles études avec le modèle hamster ont déjà fait l'objet de nombreuses publications scientifiques par plusieurs équipes, ce modèle est donc bien établi et calibré. Des études d'implantation ont été également réalisées chez la souris, démontrant leur faisabilité, mais pas avec des souches de prions humaines. Le PSP laisse en conséquence le choix du modèle murin à la discrétion du pétitionnaire (« représentatif d'une problématique de santé publique significative »).

L'étude présentée ici s'inscrit dans le cadre du PSP 2018, et porte sur l'étude de l'efficacité de 20 produits ou procédés pour éliminer et/ou inactiver les prions, dans le but de leur inscription (ou non) dans la liste des produits efficaces vis-à-vis des prions en 2021. Ces 20 protocoles ont déjà été

testés *in vitro* (par contamination/décontamination de support, et recherche de l'élément prion infectieux résiduel) et ont fait la preuve d'une efficacité maximale (absence de la forme prion infectieuse)). Compte tenu de l'urgence de la réponse à fournir (dépôt des dossiers en 2021 à la demande de l'ANSM sur la base d'études de 18 à 24 mois), les tests seront réalisés dans différents modèles *in vivo* en parallèle pour éviter l'écueil de résultats insuffisants dans les modèles basés sur les souches humaines. Ces traitements seront évalués dans le modèle d'infection expérimentale du hamster par la souche 263K, ainsi que dans deux modèles murins d'infection expérimentale impliquant deux souches de prions humains différentes : le couple souris conventionnelle Swiss - souche v-MCJ, et le couple souris humanisée (exprimant la PrP humaine) – souche de MCJ sporadique de type MM1. En parallèle, 6 de ces traitements seront testés dans deux autres modèles de souris afin de déterminer les modèles les plus pertinents. Les résultats obtenus seront comparés et publiés pour fournir à la communauté scientifique les modèles les plus adaptés pour l'évaluation de futurs produits.

Au total, cette étude portera sur 472 hamsters et 1440 souris, nés et élevés en captivité dans des établissements agréés. Ce nombre correspond au minimum nécessaire en accord avec le PSP 2018 pour obtenir des données suffisamment solides statistiquement.

Les rongeurs, hébergés en groupe dans un milieu enrichi, seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents spécifiques des maladies à prions ou de signes de souffrance incompatibles avec une survie dans des conditions décentes (perte d'autonomie, douleur ne rétrocedant pas aux traitements analgésiques, mutilation...) qu'ils soient liés ou non à l'inoculation, les animaux seront euthanasiés et la présence de protéine prion anormale sera recherchée dans leur cerveau par des techniques biochimiques et histologiques pour confirmation du diagnostic clinique établi.

13822 Dans certaines affections traumatologiques ou cancérologiques, la perte de tissu osseux est excessivement importante et ne peut cicatriser spontanément à cause de l'éloignement des berges du défaut osseux.

Ces pertes de tissu osseux nécessitent un matériau de remplacement pour conserver l'intégrité et assurer les fonctionnalités mécaniques et biologiques du squelette. Le comblement et la régénération des pertes osseuses est un défi majeur dans la chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, du rachis ou en traumatologie. Actuellement, il existe un éventail très varié de greffes osseuses d'origine biologique ou de substituts osseux synthétiques (biomatériaux).

Avant que ces matériaux ne soient utilisés chez l'homme, ils doivent passer par une série d'évaluation *in vivo* afin d'être validés et autorisés. Dans le but de reproduire une perte osseuse qui ne peut cicatriser spontanément, la notion de « défaut de taille critique » a été définie, signifiant un défaut osseux induit expérimentalement de façon à ce qu'il ne puisse cicatriser seul, en l'absence d'un biomatériau de remplacement. Dans ces conditions, le Lapin, le Chien et les petits ruminants sont les espèces les plus utilisées comme modèles *in vivo*. L'utilisation de défaut de taille critique fait partie de la démarche habituelle d'évaluation des substituts osseux. Aussi, les protocoles de recherche faisant appel à ce type de modèles sont fréquemment mis œuvre. L'implantation chirurgicale prévue ici est une procédure de routine, par ailleurs prévue par les normes qui définissent l'évaluation des biomatériaux de substitution osseuse.

A ce jour, l'évaluation de l'intégration biologique de ces substituts osseux ne peut se faire efficacement à l'issue d'analyses histologiques réalisées après prélèvement des pièces anatomiques, ou plus rarement de biopsies répétées, ce qui nécessite l'euthanasie d'animaux aux différents temps de suivi choisis. L'imagerie SPCCT (scanner spectral à comptage de photons) est une technique nouvelle qui pourrait permettre un suivi longitudinal de cette intégration biologique (résorption/substitution osseuse) chez le patient humain ou animal, de façon non-invasive, en associant à ces biomatériaux différents agents de contraste. A terme, le suivi par imagerie SPCCT permettrait de n'inclure dans les études expérimentales qu'un nombre limité d'animaux soumis régulièrement à ces examens non-invasifs.

Ainsi, cette étude doit permettre de valider de nouvelles modalités d'imagerie pour le suivi longitudinal *in vivo* de l'ostéointégration de biomatériaux de remplacement osseux, et diminuer voire supprimer la nécessité d'échantillons biologiques et de pièces anatomiques pour suivre la performance de ces biomatériaux. A l'issue de la période d'implantation, les animaux seront finalement euthanasiés et les explants soumis à divers types d'analyses histologiques afin de les mettre en relation avec les résultats l'imagerie et établir ainsi des valeurs prédictives du comportement biologique de ces biomatériaux.

Elle sera réalisée chez le Lapin dont le choix est fondé sur plusieurs critères :

- un métabolisme osseux relativement rapide, permettant d'obtenir des résultats en quelques semaines (8 à 12 semaines) ;
- la taille des animaux permet une gestion aisée de l'anesthésie et de l'analgésie ;
- ces animaux sont faciles à élever et à entretenir ;
- les modèles de reconstruction osseuse sont largement répandus et décrits dans la littérature scientifique ;
- contrairement aux rongeurs, le Lapin permet d'obtenir des explants de taille suffisante pour réaliser différents types d'analyses histologiques quantitatives (microscanner, histologie conventionnelle, microscopie électronique à balayage).

Le plan d'étude comporte à chaque fois un témoin positif/matériau de référence et le matériau à évaluer, qu'il s'agisse d'un biomatériau seul ou de composites issus de l'ingénierie tissulaire osseuse, auquel un agent de contraste aura été préalablement ajouté. Le nombre total des lapins prévus dans ce projet sur 4 ans est de 30 animaux.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacement : L'influence biologique de l'ajout d'agents de contraste (de type gadolinium) sur la résorption et la substitution osseuse des biomatériaux utilisés ne peut être envisagée que *in vivo*. Des étapes *in vitro* auront permis de fixer préalablement les quantités de produits de contraste ajoutés au biomatériau. Aucun effet néfaste postopératoire n'est attendu, les biomatériaux et produits utilisés étant tous parfaitement connus et biocompatibles, déjà couramment utilisés en médecine et en chirurgie orthopédique.
- Réduction : le nombre d'animaux utilisé est ici réduit à son minimum pour assurer une validation statistique des résultats obtenus (tests statistiques non paramétriques).
- Raffinement : le modèle animal retenu doit établir un compromis entre des capacités de remodelage osseux relativement rapide, afin d'obtenir des résultats en un temps compatible avec le projet, et un format suffisant permettant d'obtenir des explants de taille suffisante pour conduire plusieurs types d'analyses histologiques quantitatives post mortem et valider ainsi le comportement et le suivi de l'intégration biologique du biomatériau. Le Lapin représente ici le meilleur compromis. A terme, le suivi par imagerie SPCCT doit permettre de n'inclure dans les études expérimentales qu'un nombre limité d'animaux soumis régulièrement à ces examens non-invasifs afin de reproduire le suivi qui sera réalisé chez le patient humain.

Le degré de douleur induit par l'intervention chirurgicale est de sévérité modérée, parfaitement anticipée et traitée par les mesures prévues dans le protocole d'anesthésie et d'analgésie. De même, le risque de complications infectieuses postopératoires est réduit, toutes les interventions chirurgicales étant réalisés dans des conditions de bloc opératoire, avec des matériels stériles et par du personnel qualifié. Une grille de score et un suivi individuel des lapins seront mis en place.

Les conditions d'hébergement des animaux avec un enrichissement du milieu adapté (surface des cages conforme aux normes européennes en vigueur et possibilité d'hébergement collectif temporaire, mise à disposition de jouets et de compléments alimentaires, suivi par un vétérinaire...), permettent d'optimiser leur bien-être pendant toute la durée de l'étude.

13823 La maladie de Marfan est une maladie génétique autosomique dominante qui est due à une mutation dans le gène de la fibrilline-1 et qui est associée à un affaiblissement des tissus de soutien et à une augmentation de l'activité du TGFbeta. Ce Syndrome atteint le tissu conjonctif qui assure

notamment la cohésion des organes dont les plus touchés sont : l'œil, le squelette et le système cardio-vasculaire. La principale cause de mortalité de cette maladie est en rapport avec l'atteinte des vaisseaux sanguins (anévrisme et dissection aortique). Nous disposons au laboratoire de souris génétiquement modifiées contenant la mutation de la fibrilline-1 (cette mutation correspond à la forme la plus commune de la maladie chez l'homme) et qui présentent une expression anormalement élevée de TGF-beta. Les podosomes étant inductibles par le TGF-beta, nous souhaitons évaluer leur rôle dans cette maladie dans ce modèle. Le traitement médical administré actuellement chez l'humain est basé sur les beta-bloquants (Propranolol). Cependant, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, le losartan, dont l'action est de bloquer la production de TGFbeta, apporte également un bénéfice thérapeutique et peut constituer une alternative aux bêta-bloquants quand ceux-ci ne peuvent être prescrits. Dans cette étude, nous devons visualiser l'endothélium dans son état natif pour visualiser les podosomes présents sur la couche de cellules endothéliales tapissant l'aorte. Cette analyse est réalisée par des marquages fluorescents et la microscopie. Nous souhaitons procéder en prélevant l'aorte de souris génétiquement modifiées anesthésiées après injection de paraformaldéhyde pour fixer les tissus en l'état. Nous souhaitons évaluer l'effet des deux agents pharmacologiques sur la formation des podosomes. Ces souris seront sous traitement ou non à partir de l'âge d'un mois pendant 6 mois. Les prélèvements seront effectués à 7 mois. Nous prévoyons d'utiliser 40 animaux pour ces expériences (8 lots de 5 souris). Les procédures seront réalisées par du personnel formé à l'expérimentation animale et en accord avec la règle des 3R qui préconise : le Remplacement des animaux par une méthode alternative quand cela est possible : (1) seule l'observation des tissus fixés *in situ* permet de conserver le tissu dans son état natif et donc de l'observer tel qu'il se présente dans son état physiologique et fonctionnel dans le vivant. (2) Il n'est pas possible d'euthanasier l'animal. Pour cette étude, l'euthanasie modifierait les données à recueillir. Un traitement qui entrainerait la mort provoquerait la libération de médiateurs (par exemple du TNFalpha) qui pourraient engendrer la dissociation des structures d'actine que nous cherchons à étudier, (3) Les podosomes sont maintenant très bien caractérisés *in vitro* mais, à ce jour, ces analyses ont atteint leurs limites. Il est maintenant nécessaire de comprendre comment les podosomes fonctionnent *in vivo* pour progresser dans les connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'invasion cellulaire et de l'homéostasie de certains tissus ; la Réduction du nombre d'animaux : nous allons inclure 40 animaux dans cette étude repartis en 8 groupes (Pour chaque groupe, nous avons pris en compte : (1) les difficultés inhérentes à la microdissection et à la fixation des aortes et (2) de la variabilité expérimentale) ; le Raffinement favorise le comportement naturel des animaux pour éviter tout stress (nous serons, dans ce cadre, attentifs à l'enrichissement du milieu (litière, abris)). Des points limites seront établis afin d'éviter toute souffrance inutile des animaux (surveillance comportementale, non isolement). Des observations quotidiennes seront réalisées afin de s'assurer du bien-être des animaux. La procédure d'injection intracardiaque sera réalisée sous anesthésie générale et sera sans réveil.

13824 L'infiltrat immunitaire tumoral est l'objet de nombreuses études. La compréhension du rôle des leucocytes infiltrant la tumeur, particulièrement celui des lymphocytes T CD8+ a permis de grandes avancées thérapeutiques. Des études récentes ont démontré que des altérations métaboliques spécifiques aux cellules tumorales pouvaient influencer l'infiltrat immunitaire tumoral. La poly ADP-ribose polymérase-1 (PARP1) est une enzyme dont le rôle central sur la régulation du métabolisme cellulaire a récemment été démontré. De façon intéressante, l'hyperactivité de PARP1 dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) est de mauvais pronostic, contrairement à l'infiltrat immunitaire des lymphocytes T CD8+. L'objectif de ce projet sera d'explorer les relations mécanistiques entre l'activité de PARP1 dans les cellules cancéreuses et la réponse immune anti-tumorale. Pour cela, nous utiliserons plusieurs modèles murins de CBNPC sous-cutanés ou orthotopiques caractérisés par des activités élevée ou basses de PARP1. Les trois procédures expérimentales proposées dans ce projet devraient permettre: 1) de déterminer si les tumeurs avec une hyperactivité de PARP1 influencent négativement l'infiltrat immunitaire anti-tumoral dans les modèles murins ; 2) d'évaluer si la manipulation du métabolisme tumoral dépendant de PARP1 permet de modifier positivement l'infiltrat immunitaire tumoral ; et 3) d'empêcher la croissance tumorale par l'injection d'un inhibiteur pharmacologique de PARP1 associé ou non à une immuno-

thérapie ciblée. La croissance tumorale sera mesurée de façon non invasive soit par bioluminescence soit à l'aide d'un pied à coulisse pour les cancers orthotopiques ou sous-cutanés respectivement. La densité, la composition et la fonction de l'infiltrat immunitaire tumoral se fera par cytométrie de flux et RT-PCR. Ce projet devrait permettre l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les cancers bronchiques agressifs caractérisés par une hyperactivité de PARP1. L'étude de l'immuno-surveillance des cancers ne peut être réalisée qu'*in vivo* dans un modèle animal en raison des multiples facteurs mis en jeu. Ce projet d'une durée de 4 ans impliquera l'utilisation au maximum de 520 souris femelles (480 C57BL/6 et 40 Nude ; 10 souris par groupe expérimental). L'ensemble des procédures a été mis au point pour permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. L'étude sera stoppée si les expériences initiales sont négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de garder un nombre minimum d'animaux dans les groupes contrôles. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou de tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Le suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et la douleur au cours de l'expérimentation. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

13825 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une affection critique des poumons responsable d'un tableau d'hypoxémie sévère, secondaire à la formation brutale d'un œdème inflammatoire et abondant au sein des poumons. Les causes de SDRA sont le plus souvent infectieuses (pneumopathies ou autres infections sévères), traumatiques ou toxiques. Ce syndrome est relativement fréquent (10% des admissions en réanimation), avec une mortalité élevée (entre 30 et 50%).

Les bases du traitement sont de traiter la cause du SDRA, et l'utilisation de la ventilation mécanique à l'aide d'un respirateur artificiel. Celui-ci permet d'assurer une oxygénation sanguine suffisante. Toutefois, des réglages inadéquats de la ventilation mécanique pouvant entraîner une surdistension des alvéoles pulmonaires à chaque insufflation, autrement appelée hyperinflation cyclique. Cette surdistension peut entraîner une rupture des alvéoles, leur étirement excessif, et entretenir la formation de l'œdème inflammatoire. Lorsqu'il est observé, ce phénomène s'accompagne d'une surmortalité des patients avec SDRA.

A ce jour, nous manquons de moyens fiables pour évaluer l'hyperinflation cyclique, ce qui limite nos capacités à ajuster les réglages du respirateur afin de la contrôler. Le scanner X pulmonaire offre cependant la possibilité de mesurer l'hyperinflation cyclique de façon non-invasive, et de façon répétée à différents réglages du respirateur. La tomographie par émissions de positrons (TEP, une technique d'imagerie nucléaire) peut, quant à elle, nous renseigner de façon non-invasive sur l'intensité de l'inflammation pulmonaire. En couplant le scanner et la TEP, nous pouvons donc évaluer le lien entre l'agression mécanique des poumons que représente l'hyperinflation cyclique, et l'inflammation pulmonaire, au cours du SDRA.

En quantifiant l'hyperinflation cyclique à l'aide du scanner X, et en observant potentiellement un lien significatif avec l'inflammation pulmonaire mesurée en imagerie nucléaire, nous apporterons un élément de réponse important à la physiopathologie des lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique.

De plus, le scanner étant un outil diagnostique utilisé en pratique clinique courante, cette méthode de quantification de l'hyperinflation cyclique par le scanner X pourrait permettre à l'avenir d'ajuster les réglages du respirateur afin de limiter l'hyperinflation cyclique, et ainsi rendre la ventilation mécanique moins délétères pour les poumons et le patient.

Il est prévu d'utiliser 18 porcs au maximum compte-tenu d'un nombre de décès prématuré (lors de la genèse du SDRA expérimental) attendu de 30% dans ce type d'expérience.

Les animaux seront placés sous anesthésie générale profonde, comprenant entre autre une analgésie par opioïdes puissants, comparable à celle utilisée chez l'homme pour les chirurgies lourdes, et est maintenue durant toute la durée du protocole (environ 8 heures). Les effets néfastes du SDRA expérimental sont une hypoxémie profonde, comparable à celle observée chez les patients de réanimation avec SDRA. Le ressenti de l'hypoxémie est nul sous ces régimes de sédations. A la fin du protocole, ils seront euthanasiés par surdosage des drogues anesthésiques.

Application des 3 Rs

1. Remplacement : Un modèle animal doit être utilisé car il n'est pas possible de valider la technique chez l'homme car le nombre de scanner requis est responsable d'une irradiation qui serait inacceptable pour les patients. De plus, il est très difficilement envisageable de déplacer un patient de réanimation dans d'une caméra TEP sans le mettre en danger. Il n'existe pas à ce jour d'alternative non humaine, non animale pour simuler un SDRA.

2. Réduction : A l'aide de données précédemment obtenues, nous avons réalisé un calcul de puissance afin de déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaires à la recherche. La réalisation de mesures répétées chez un même animal permet de diviser par 2 le nombre d'animaux requis.

3. Raffinement : Le choix du porc comme modèle expérimental repose sur le fait qu'il s'agit d'une espèce à la fois anatomiquement et physiologiquement proche sur le plan respiratoire des primates et de l'Homme. De plus, la morphométrie (volume pulmonaire) de l'animal permet l'utilisation de la même technique de ventilation (respirateur artificiel) et d'imagerie (scanner X et TEP) que chez l'homme. Le SDRA expérimental est réalisé par inhalation d'acide chlorhydrique alors que l'animal est comateux et puissamment analgésié et ce jusqu'à la fin du protocole. Le protocole d'anesthésie et les doses utilisées font que l'animal ne ressentira aucune douleur. Il doit être euthanasié en fin d'expérience par surdosage des drogues anesthésiques car l'atteinte respiratoire est incompatible avec la survie sans ventilation mécanique.

13826 Récemment le système immunitaire a été démontré crucial dans l'efficacité des différents traitements anticancéreux. De façon intéressante, il a été montré qu'une restriction calorique par le jeûne avant traitement anticancéreux permettait d'améliorer l'efficacité du traitement notamment par stimulation du système immunitaire. A la suite de ces recherches, une nouvelle classe de molécule a été identifiée et caractérisée : les composés mimant la restriction calorique. Ces composés permettent d'obtenir un effet similaire au jeûne en combinaison à la chimiothérapie. L'objectif de ce projet est donc de comprendre l'implication du système immunitaire dans l'efficacité de ces traitements, et de le mettre à profit pour augmenter l'efficacité de ces combinaisons sur le contrôle de la croissance tumorale. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale. Nous utiliserons des souris C57Bl/6 (maximum de n=3744). Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des études de croissance tumorale et des analyses immunologiques ex-vivo. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure

également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

13827 La SLA (Sclérose Latérale Amyotrophique) est une maladie du neurone moteur qui se traduit par la perte des motoneurons et conduit à la paralysie puis au décès des patients dans un délai d'environ 5 ans après le diagnostic. La maladie se présente sous deux formes, une forme sporadique représentant 90% des cas et une forme familiale représentant les 10% restant. 20% de la forme familiale sont dus à une mutation d'un gène à l'origine d'une accumulation de protéine dans les cellules, entraînant une toxicité et la mort cellulaire. C'est sur cette forme de la pathologie que notre projet est focalisé. Notre groupe a récemment développé une stratégie de thérapie génique prometteuse. Nous avons utilisé un vecteur viral modifié pour réduire le niveau de protéine toxique à la fois dans le système nerveux central et les organes périphériques des souris malades. Cette thérapie s'est révélée très efficace pour soigner les souris nouveau-nés et représente la thérapie la plus efficace obtenue jusqu'à présent chez les souris SLA adultes (travaux récompensés par un prix international et stratégie brevetée). Nous progressons actuellement vers une application clinique de cette stratégie ; en particulier, nous définissons la dose optimale de vecteur à injecter pour procéder au test clinique. En parallèle à ces études, nous travaillons sur l'amélioration de cette stratégie. En effet, une des préoccupations majeures pour l'application clinique de notre stratégie (réduction de la synthèse de protéine mutée et toxique) est l'induction d'effets secondaires possibles due au ciblage non sélectif (mutant et normal) de la SOD1. Cette enzyme joue un rôle essentiel dans la protection des cellules contre le stress oxydatif et son élimination pourrait nuire à la physiologie cellulaire. Il a d'ailleurs été démontré que la perte fonctionnelle de la SOD1 peut modifier la gravité de la maladie dans des modèles animaux.

L'objectif de ce projet est donc de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique innovante afin de réduire l'expression de SOD mutée toxique dans les cellules (Erase) tout en permettant la réexpression de la protéine non mutée (Replace), essentielle à la physiologie cellulaire, le tout en un seul traitement. Dans l'ensemble, ce projet contribuera à l'avancement préclinique de notre thérapie génique développée pour la SLA liée à la SOD1 et servira de preuve de concept pour l'application à d'autres stratégies de « silencing » en cours de développement pour les patients SOD1-SLA.

La première partie du projet consistera à étudier les effets du traitement au niveau cellulaire et moléculaire. Pour se faire des animaux adultes seront injectés directement dans la moelle épinière (effet localisé) et nous comparerons les effets du vecteur thérapeutique aux vecteurs contrôles. Nous testerons ensuite l'effet thérapeutique de notre stratégie chez les nouveaux-nés malades (traitement précoce). Pour ces deux premières expériences nous analyserons 4 groupes différents + 1 groupe contrôle non injectés. Le tout comparé à deux groupes déjà analysés pour un autre projet qui nous serviront de référence (l'utilisation d'animaux appartenant à d'autres projets fait partie de la procédure de Réduction du nombre d'animaux utilisés). Une fois la stratégie thérapeutique validée nous suivrons son effet sur la survie d'une part, mais également sur le poids, le comportement moteur, la force d'autre part. Enfin des analyses de microscopie électronique nous permettront de suivre l'impact du traitement sur les mitochondries qui, d'après de récentes recherches, semblent particulièrement sensibles à l'accumulation de protéine SOD dans les cellules. Pour ce projet un total de 235 souris SOD sera utilisé. La constitution des groupes sera homogène (ratio 1/1, mâle/femelle) et les points limites rigoureusement établis. L'ensemble des procédures seront réalisées suivant les directives européennes relatives à l'utilisation d'animaux en expérimentation.

Dans le cadre de l'application des 3R des données *in vitro* seront croisées aux données *in vivo* afin de remplacer des besoins excessifs en animaux. Ceci permettra une caractérisation plus complète et plus pertinente. Nous suivrons également les prérogatives de différents documents utilisant cette souche qui orientent et conseillent les chercheurs notamment sur le nombre d'animaux à utiliser par groupe pour obtenir des résultats cohérents et permettre ainsi de réduire au maximum leur utilisation. Les animaux SLA (hétérozygotes), identifiés par génotypage, nous sont cruciaux pour réaliser notre projet et pour entretenir notre lignée (mâles reproducteurs). Ils serviront également

de contrôle de non dérivation de la colonie. Tout au long de leur vie les animaux seront suivis quotidiennement permettant ainsi une habituation à notre présence et une réduction du stress. Lors de l'apparition des symptômes un suivi particulièrement important sera réalisé afin de suivre continuellement, et au cas par cas, l'évolution de la maladie pour chacun des animaux. Dans le but d'améliorer et de raffiner les conditions de vie des ceux-ci un enrichissement sera apporté dans la cage des animaux.

13828 La connaissance des systèmes antioxydants permettant aux animaux de faire face à un stress en cours d'élevage (variation de température, contamination par un pathogène, changement d'aliment...) reste un enjeu majeur pour l'aviculture. Ces systèmes peuvent varier à la fois en fonction de la souche étudiée et de l'âge des animaux. En effet, la robustesse des poussins s'accroît avec l'âge. Par ailleurs, les souches à croissance rapide sont plus sensibles aux perturbations des conditions d'élevage. A ce jour, aucune étude ne s'est vraiment intéressée à ces deux facteurs et leur interaction. Ce projet a pour but d'approfondir ces connaissances en étudiant le statut antioxydant basal des animaux de 3 souches différentes en fonction de l'âge, jusqu'à l'abattage. Les souches à croissance rapide (Ross 308) et intermédiaire type certifié (Hubbard JA 957) resteront en élevage jusqu'à 56 jours tandis que la souche à croissance lente type Label Rouge (Hubbard JA 657) le restera jusqu'à 84 jours. Régulièrement, 10 animaux seront sacrifiés pour prélever différents tissus (sang, filet, cuisse, foie, cœur) qui permettront ensuite la mesure de différents paramètres et enzymes impliqués dans le statut antioxydant et les défenses contre l'oxydation de ces animaux. Dans cet essai 390 poulets seront mis en place (120 Ross 308, 120 JA957, 150 JA657). Uniquement 290 animaux seront soumis au prélèvement de sang (90 Ross 308, 90 JA 957, 110 JA 657).

Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux mis en élevage, l'expérimentation ne portera que sur des poulets mâles qui sont plus sensibles aux variations des conditions d'élevage que les femelles. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Les femelles produites simultanément par le couvoir seront destinées à des fins commerciales.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif appliqué du projet en physiologie animale et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

Raffinement : Les poulets seront élevés en groupes et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Le milieu sera enrichi avec des balles en plastique de couleur. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation.

13829 Nous proposons à nos étudiants en DUT Génie Biologique la formation à l'expérimentation animale Niveau 2/A en 1ère année du DUT et pour les étudiants en 2ème année ABB, titulaires de ce Niveau 2/A, nous mettons en place la formation réglementaire : Initiation à la chirurgie expérimentale. Les 4 procédures décrites dans cette demande vont permettre l'acquisition des techniques de cathétérismes vasculaires conformément à cette formation réglementaire ainsi que la consolidation des compétences acquises en chirurgie expérimentale. Les techniciens hautement qualifiés en expérimentation animale sont des professionnels très recherchés dans notre bassin d'emploi particulièrement en R&D de l'industrie pharmaceutique et en milieu hospitalier. Les techniques de cathétérismes vasculaires sont couramment utilisées et permettent l'injection de substances (voie veineuse) ou le prélèvement de sang (voie artérielle). On peut mettre en évidence les effets de substances d'origine naturelle ou synthétique sur l'organisme entier, ceux-ci n'étant pas visualisables par des méthodes alternatives telles que les méthodes actuelles de biologie cellulaire et moléculaire ou les expérimentations assistées par ordinateur. Ces techniques permettent d'appréhender la variabilité interindividuelle, d'étudier des phénomènes physiologiques expérimentaux complexes et le mode d'action des médicaments.

L'approche de ces techniques de cathétérismes sera très progressive : observation de vidéos commentées pas à pas, entraînement sur supports non vivants (utilisation de rats mannequins) puis passage à l'animal : le rat, (Règle des 3 R : Réduction, Remplacement, Raffinement).

Les étudiants mettront ensuite, en pratique cet apprentissage pour consolider leurs compétences acquises en chirurgie expérimentale, au cours de 3 procédures nécessitant la pose de cathéter (au lieu de 8 initialement, Règle des 3R : Réduire) avec mise en oeuvre systématique des techniques aseptiques. Ils utiliseront des méthodes pratiquées en milieu professionnel : enregistrement de la motricité digestive par électromyographie, mesure de la pression artérielle par voie sanglante et test fonctionnel hépatique à la BSP.

Les animaux seront euthanasiés en fin de séance. Nous utiliserons 30 rats/ protocole, (1 rat/ binôme) soit 120 rats/ an pour les 4 protocoles sus-cités, (total 360 rats/ 3 ans). Après avis du vétérinaire référent, ils seront tous réutilisés de projets précédents de classe légère, aucun animal supplémentaire ne sera commandé, (Règle des 3R : Réduire).

13830 La fibrose hépatique est la conséquence de toutes les maladies chroniques du foie et ce, quelle qu'en soit la cause (virus, médicaments, alcool, obésité...). La fibrose se caractérise par la présence d'un tissu cicatriciel dans le foie. Elle peut évoluer vers la cirrhose qui s'accompagne d'une perte progressive des fonctions hépatiques et peut évoluer dans un certain nombre de cas, vers le cancer hépatique. Les cellules hépatiques stellaires sont les principales cellules du foie impliquées dans le processus de fibrose. Dans un foie sain, ces cellules sont au repos. Lors d'une maladie hépatique, les cellules hépatiques stellaires s'activent, sécrètent de la matrice extracellulaire en excès, ce qui génère la fibrose.

Nous avons identifié une protéine, PRDM16, dont l'expression est induite spécifiquement au cours de l'activation des cellules hépatiques stellaires. Notre hypothèse est que PRDM16 pourrait jouer un rôle dans la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire par les cellules hépatiques stellaires et donc participer à la fibrose. Nos résultats préliminaires montrent qu'en l'absence de PRDM16, la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène est diminuée dans une lignée de cellules hépatiques stellaires. Afin de valider ces résultats *in vivo*, nous avons généré un modèle de souris chez lequel PRDM16 est absent spécifiquement dans les cellules hépatiques stellaires (souris PRDM16 floxées croisées avec des souris exprimant la Cre-recombinase spécifiquement dans les cellules hépatiques stellaires (LRAT-Cre)). Nous souhaitons soumettre ces animaux à différents régimes pro-fibrogéniques et étudier la conséquence de l'absence de PRDM16 sur la progression de la fibrose.

Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, dans le but de déterminer le rôle de PRDM16 dans la régulation de voies de signalisation de la fibrose au sein du tissu hépatique, l'utilisation des modèles de rongeurs est nécessaire.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Un animal servira pour plusieurs expériences (exemple : traitement pro-fibrogénique, sacrifice, examen d'histologie et de biologie moléculaire sur les tissus d'intérêt). 600 souris et 300 rats seront nécessaires à la réalisation de nos objectifs. Le modèle souris est utilisé dans ce projet, les modèles génétiques ayant été validés chez cet organisme. La souche C57Bl/6J a été privilégiée car sa physiologie est connue et il est bien décrit qu'un régime obésogène et/ou diabétogène est capable d'induire une insulino-résistance en quelques semaines chez cette souche. Le rat est préféré à la souris concernant la mise en culture de cellules hépatiques stellaires primaires car il permet d'obtenir un plus grand nombre de cellules et, par conséquent, de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Enfin, l'aspect et le comportement des animaux seront évalués quotidiennement par les personnels de l'animalerie et un suivi de poids des animaux sera effectué de façon bi-hebdomadaire par les expérimentateurs en charge de l'étude. Ce suivi rapproché permettra une détection précoce de toute souffrance subie par les animaux et, le cas échéant, entraînera l'euthanasie immédiate.

13831 Les maladies neuromusculaires regroupent un ensemble hétérogène de maladies conduisant à la dégradation des muscles squelettiques et/ou cardiaque. La plupart de ces maladies a une origine génétique.

Des traitements de thérapie génique (faisant appel à des virus afin de délivrer la molécule thérapeutique) commencent à montrer leur potentiel mais de nombreuses améliorations s'avèrent généralement nécessaires. Les 2 points faibles majeurs de ces approches de thérapie génique sont d'une part le faible niveau d'expression des protéines thérapeutiques véhiculées dans le virus, et d'autre part leur expression dans des tissus non désirés pouvant entraîner des effets toxiques.

L'expression des gènes est dépendante de séquences promotrices (appelées promoteurs) situées en amont des gènes. Ainsi, certains promoteurs permettent une expression spécifique dans un tissu donné, ou au contraire dans tous les tissus de l'organisme. De même, certains promoteurs conduisent à une expression très forte, d'autres à une expression faible. A l'heure actuelle, il n'existe pas de promoteur spécifiquement musculaire (muscles squelettiques et cardiaque) conduisant à une expression forte des gènes. Pour pallier à ce problème, nous avons créé un promoteur hybride muscle spécifique fort à partir de différents morceaux de promoteurs musculaires. Ce promoteur hybride a montré sa très forte expression dans différents modèles de cellules musculaires ou cardiaque en culture, alors qu'il n'est pas détecté dans d'autres types cellulaires. Pour aller plus loin sur la validation de notre promoteur hybride comme outil de thérapie génique, nous avons besoin de valider nos données obtenues *in vitro* par des expériences *in vivo*, avec comme animal modèle : la souris. En effet, la plupart des modèles de maladies génétiques conduisant à des atteintes des muscles striés et la majorité des essais précliniques de thérapie génique sont réalisés sur des souris.

Trois constructions seront comparées : la construction contenant un promoteur fort sans spécificité cellulaire (promoteur du CytoMegalovirus, ou pCMV), la construction contenant un promoteur spécifiquement musculaire et cardiaque (promoteur de la desmine, ou pDes) et enfin, la construction contenant notre promoteur musculaire hybride (promoteur hybride musculaire, ou pMH). Ces 3 promoteurs permettent l'expression d'une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein, ou GFP), permettant de suivre facilement l'expression des constructions sans effet délétère. Toutes ces constructions sont intégrées dans un virus ayant démontré son efficacité à cibler les muscles squelettiques et cardiaque, bien que sa diffusion tissulaire soit relativement large.

Deux types d'injection classiquement utilisés dans les approches de thérapie génique des muscles seront testés : l'injection intramusculaire et l'injection systémique.

Pour l'injection intramusculaire, 3 souris par construction seront injectées (soit au total 9 souris). Les injections seront réalisées entre 2 et 3 jours après la naissance et les analyses seront réalisées 6 semaines après les injections.

Pour les injections systémiques, 5 souris par construction seront injectées (soit 15 souris en tout). Les injections sont réalisées à 2-3 jours post-natals et les analyses seront réalisées 8 semaines post-injections.

Dans tous les cas, les souris sont anesthésiées avant l'injection. Les souris injectées sont ensuite replacées dans des cages enrichies en matériel permettant de diminuer l'angoisse des animaux. Les souris sont suivies quotidiennement jusqu'à leur sacrifice. Si des signes de souffrance sont détectés lors de ce suivi, des analgésiques seront donnés, ou si la douleur est jugée trop forte, les souris seront sacrifiées.

Ainsi ce projet nécessite en tout 24 souris. C'est le nombre minimum de souris que nous pouvons utiliser afin d'avoir des résultats statistiques de comparaison de nos différentes constructions.

13832 Les troubles de la croissance périnatale liés à un faible poids à la naissance ou à une nutrition inadéquate du nouveau-né prématuré constituent un problème de santé général dans le monde. La prévention est le moyen d'action privilégié par les autorités sanitaires. Le ciblage spécifique des microARNs endogènes qui jouent des fonctions cruciales dans la physiologie cellulaire, pourrait permettre de dégager une piste thérapeutique en concevant une supplémentation orale avec des micronutriments déjà présents dans le lait. Nous avons conçu une méthode pour fournir oralement des microARNs intégrés dans des vésicules biomimétiques, inoffensives et efficaces.

Ce projet sera réalisé chez le raton Wistar ou le raton Sprague-Dawley issu d'une souche de rat transgénique (rat eGFP) obtenue au laboratoire. Nous testerons deux stress nutritionnels, le

premier sera un régime visant à induire une programmation nutritionnelle constitué d'un apport hypergras ; le second sera un sevrage précoce consistant à séparer les petits de la mère au quinzième jour d'allaitement.

Le projet durera cinq ans. Le nombre total de rats sera de 180. Cela représente 20 portées de 8 ratons (mâles et femelles) à partir du jour-12 en plus des 20 mères correspondantes. Soit un nombre total de ratons (mâles et femelles) pour une seule formule de Nanotaxi et un seul microARN de 80. Pour des raisons de comparaison scientifique, nous nous réservons la possibilité d'ajouter un autre microARN.

Concrètement, nous avons sélectionné par un travail antérieur une heure d'inoculation optimale pour l'effet biologique recherché. Nous désirons explorer les effets biologiques de l'inoculation orale de deux microARNs et de deux stress nutritionnels sur la physiologie de jeunes rats de 35 jours. Nous garderons les mâles et les femelles de la portée jusqu'à 35-40 jours de vie avant de les sacrifier (en notant le sexe pour des raisons de traçabilité bien que nous n'avons pas trouvé d'effet sexe). Le jour du sacrifice, le sang sera collecté dans des tubes ; l'estomac, le duodénum et l'intestin grêle seront prélevés ainsi que le foie et le cerveau. Les morceaux seront conservés à -80°C, après congélation dans l'azote liquide, en vue de l'analyse de l'expression génique et protéique.

La règle des 3 R sera respectée :

Raffinement : Les animaux ne subiront qu'une seule contrainte, un bolus oral d'une solution de Nanotaxi et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies pour le bien-être des animaux.

Les ratons seront surveillés quotidiennement. Dans le cas d'une perte de poids, d'une modification de la prise alimentaire, de l'apparence générale ou du comportement, la surveillance sera accentuée et les ratons seront soignées et/ou placées sous antidouleurs afin de minimiser toute souffrance, détresse ou inconfort. Enfin, si l'animal ne parvenait pas à se rétablir, la mise à mort serait envisagée. Le nombre d'animaux pour chacune des expériences a été fixé de façon à éviter une sur-utilisation d'animaux tout en permettant une bonne exploitation statistique des résultats.

Réduction : Le nombre de ratons a été réduit au minimum, avec répétition du protocole en cas de tendance positive pour atteindre un nombre statistiquement significatif et pour pouvoir tester un effondrement qualitatif de l'expression de la cible-clé du microARN (correspondant soit au microARN, à l'ARN messager-cible ou à la protéine correspondante).

Remplacement : L'étude *in vivo* est nécessaire pour tenir compte de la complexité physiologique de l'interférence à ARN pour prévenir le risque de syndrome métabolique. Aucun modèle cellulaire ou mathématique ne peut reproduire la complexité de cette pathologie. Le raton représente un bon modèle largement exploité au laboratoire.

13833 Projet : Les défauts de cicatrisation constituent en pathologie humaine un problème de santé publique dans les pays occidentaux mais aussi dans ceux en voie de développement. De manière plus précise, 1 à 2% des personnes vivant dans le monde occidental développera un ulcère des membres inférieurs. Chaque année aux Etats-Unis, 6,5 millions de personnes présentant des ulcères chroniques. En Europe, 5 à 15 % des personnes âgées de 30 à 70 ans sont atteintes d'une insuffisance veineuse des membres inférieurs, parmi lesquelles au moins 1% seront compliquées d'ulcère variqueux. Aux Etats Unis, le coût global lié aux soins et à la morbidité des plaies cutanées est estimé à 13 à 15 milliards de dollars par an et celui des traitements des ulcères veineux à lui seul s'élève à 3 milliards. Il apparaît donc important de développer de nouveaux traitements efficaces et facilement accessibles pour les problèmes de cicatrisation cutanée.

Le but de ce projet est donc de mettre en place un modèle murin d'ulcère de pression et d'étudier l'effet d'une thérapie cellulaire issue de fibroblastes de gencive sur la cicatrisation cutanée altérée.

Type d'animaux : Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons deux modèles murins transgéniques sur fond génétique C57BL/6j.

Nombre d'animaux :

Ce projet est une étude pilote qui impliquera l'utilisation d'un total de 60 souris expérimentales pour une durée maximale de 1 an. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre

l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans la cicatrisation cutanée et ses complications. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

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

13834 Le choc anaphylactique (CA) est un évènement relativement rare, mais associé à une mortalité importante.

L'étude du CA chez l'Homme est complexe et rend impossible la réalisation d'essais thérapeutiques. Plusieurs raisons sont à l'origine de ces difficultés :

-La survenue d'un CA est complètement imprévisible, notamment en anesthésie où la réaction apparaît dans les minutes suivant l'exposition à un allergène. Il s'agit d'un évènement rare, pouvant survenir dans n'importe quel bloc opératoire, ce qui rend impossible la réalisation de tout essai randomisé contrôlé.

-Les signes cliniques ne sont pas spécifiques et le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. L'obtention des résultats biologiques nécessite plusieurs jours.

-Les mécanismes mis en jeu lors de ces réactions sont multiples. Le mécanisme de la réaction peut être d'origine immunologique (médié par les IgE ou les IgG) ou non-immunologique (histaminolibération non spécifique). La compréhension du mécanisme de la réaction et l'identification de la substance en cause nécessitent une consultation d'allergologie qui ne peut être réalisée que 4 à 6 semaines après la réaction.

Ces raisons mettent en lumière l'importance d'un modèle animal fiable de CA d'origine immunologique. Les animaux utilisés seront des souches de rats Brown Norway et Fawn Hooded. Le remplacement des animaux est impossible, car un modèle humain ou in-vitro est impossible à mettre en place.

L'utilisation de modèles animaux est ainsi primordiale pour comprendre les mécanismes du CA et proposer des améliorations thérapeutiques. Pour mener à bien notre projet d'études sur 5 ans, un total de 575 rats est nécessaire. Ce nombre a été réduit au strict minimum pour pouvoir dégager des résultats statistiquement significatifs avec la prise en compte d'éventuelles complications lors des manipulations. Les rats seront hébergés en groupes sociaux de 5 rats par cage. Ils disposeront d'une alimentation et de boisson ad libitum. Le contrôle de l'éclairage et de l'hygrométrie dans la pièce sera rigoureux pour maintenir un cycle nyctéméral.

Le bien-être animal sera assuré par le respect de la règle des 3R :

•La Réduction le nombre d'animaux par l'utilisation d'un protocole expérimental établi au préalable qui permettra de limiter l'utilisation d'animaux aux seules expérimentations indispensables en évitant des répétitions inutiles. Les tests statistiques utilisés permettront d'établir des analyses statistiques avec un nombre de rats minimal.

•Le Raffinement des expérimentations permettra de limiter la douleur des animaux. Ainsi toutes nos expériences se feront sous anesthésie générale avec la mise en place d'une analgésie par voie IV. Notre modèle de CA permet de réduire le temps d'expérimentation car seules des situations aiguës seront étudiées (quelques heures) et non chroniques (plusieurs jours). Les rats seront hébergés en groupes sociaux de 5 rats par cage dès réception des animaux. En effet leur petite taille et leur petit poids permettent cette disposition pour développer un lien social. Progressivement nous séparons les animaux selon leur poids avec 2 types de cages (moyenne et grande) pouvant accueillir un nombre de rats différent (cf. Points limites). Pour l'enrichissement nous utilisons, en plus des morceaux de bois, des cylindres de coton, des rectangles composés de lanières de peuplier compressées ou de lanières de papier permettant de stimuler l'activité naturelle et de construire des nids.

Une grille de score comprenant des critères cliniques et comportementaux a été établie par notre équipe avec des points limites objectifs associés à un algorithme décisionnel (cf. Annexe 4). Ces points limites seront évalués à partir de la période de sensibilisation des rats jusqu'à leur utilisation. Le suivi des animaux se fera quotidiennement par notre équipe en collaboration avec des zootechniciens de l'animalerie.

•Le Remplacement d'un modèle *in vivo* par un modèle *in vitro* est à l'étude, mais en l'état actuel des connaissances il est impossible d'étudier le CA, avec toutes ces voies de signalisations, sans un modèle animal global.

Le traitement actuel du CA (remplissage vasculaire et adrénaline) n'est pas pleinement satisfaisant. Il présente en effet au moins trois faiblesses essentielles. Premièrement, les recommandations ne reposent que sur des avis d'experts, élaborés à partir d'extrapolations de cas cliniques. Deuxièmement, certains CA sont réfractaires à ce traitement et peuvent être mortels. Troisièmement, l'adrénaline utilisée à forte dose peut engendrer des troubles cardiaques venant compliquer une situation déjà difficile.

Notre équipe a pour but de mieux comprendre les mécanismes du CA à fin d'améliorer la prise en charge thérapeutique.

En effet nous avons montré que (1) la défaillance cardiaque est un élément précoce et prépondérant lors du CA. Dans ce cadre l'utilisation d'adrénaline est nécessaire, mais son index thérapeutique est particulièrement étroit. L'utilisation de nouveaux traitements étiologiques (c'est-à-dire agissant directement sur le mécanisme du CA) permettrait de limiter l'utilisation d'adrénaline et (2) La consommation en oxygène des mitochondries musculaires squelettiques est paradoxalement élevée lors du CA, traduisant une dysfonction mitochondriale précoce. (3) Les plaquettes jouent un rôle d'amplification de la réaction anaphylactique. Une fois activées elles libèrent de grandes quantités de sérotonine et de Platelet Activating Factor. Ces médiateurs ont un effet propre sur le système cardiovasculaire et bronchique aggravant ainsi la symptomatologie du CA. Les mécanismes d'activation plaquettaire sont encore mal connus. Il apparaît donc important d'étudier cette nouvelle voie activée au cours du CA afin d'en dégager de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Notre projet sur 5 ans repose sur l'exploration de trois grands axes qui répondent à nos deux objectifs : étudier les mécanismes du CA et proposer de nouvelles voies thérapeutiques :

- Etude de la dysfonction endothéliale au cours du CA et effets de différents solutés de remplissage.
- Etude du métabolisme énergétique cellulaire du muscle squelettique et cardiaque lors du CA et effets de traitement à visée mitochondriale.
- Étude de la dysfonction plaquettaire au cours du CA et approche thérapeutique par le blocage de la voie sérotoninergique et du Platelet Activating Factor.

13835 L'évaluation de la toxicologie préclinique est l'étape la plus critique du développement d'un médicament. Elle représente environ 20% du coût total du développement du médicament. Une grande partie des programmes de développement de médicaments (environ 70%) échouent en raison d'une toxicité ou de problèmes inattendus lors de la validation de phase 1 sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) chez l'homme. Dans ce contexte, l'utilisation de

souris PIRF dont le foie peut être humanisé est un modèle robuste et fiable permettant d'effectuer les tests précliniques de composés candidats pour le traitement de pathologies hépatique. Dans le cadre de ces études précliniques, ce modèle de souris PIRF permet de remplacer les cellules hépatiques murines par des cellules hépatiques humaines (hépatocytes). Ce remplacement effectué par greffe d'hépatocytes humains permet d'obtenir un modèle de souris avec un foie humanisé qui sera également utilisé pour caractériser l'efficacité de candidats médicaments visant à guérir les infections virales (hépatites) ou le cancer du foie.

A ce jour, il n'est pas encore possible de modéliser les fonctions hépatiques *in vitro*. Ni le métabolisme ni les maladies du foie ne peuvent être mimés de manière adéquate (prédiction de la réponse humaine). Il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme, le recours à un modèle animal apparaît comme la meilleure stratégie pour étudier l'efficacité et la toxicité de candidats médicaments. Dans le contexte des maladies hépatiques, la souris au foie humanisé constitue le seul modèle valable, robuste et prédictif pour tester la sécurité et l'efficacité de nouveaux médicaments.

Dans ce contexte, notre intervention aura pour objectifs de garantir la pérennité du modèle murin PIRF (stratégie de cryoconservation de la lignée sous forme d'embryons) et de garantir un statut sanitaire sain pour ces animaux (décontamination par transfert d'embryons). Les procédures de cryoconservation d'embryons et de décontamination par transfert d'embryons s'inscrivent dans le cadre de la règle des 3R. En effet, la cryoconservation est une technique qui permet non seulement de réduire l'utilisation d'animaux vivants dans les échanges de modèles entre instituts ou centres de recherche mais aussi de sécuriser ceux-ci sur la maîtrise des conditions sanitaires lors des échanges. De plus, la technique de transfert d'embryons permet l'acquisition d'un statut sanitaire de haut niveau, mais aussi de réduire de façon conséquente la part d'animaux utilisés lors de la phase d'élevage des animaux utilisés en expérimentation. Cette procédure est appliquée sur l'ensemble de nos projets. Cette technique est aujourd'hui une des bases de la maîtrise du nombre d'animaux utilisés lors de la phase de production des lots destinés à l'expérimentation.

Une fois décontaminée, la lignée PIRF sera hébergée au sein de notre structure agréée afin de produire les animaux nécessaires pour ces études précliniques. Dans le cadre de ce projet, et pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages (matériel de nidification et bâtons de bois à ronger) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Les souris PIRF dont le foie peut être humanisé présentent, en basal, des troubles hépatiques pouvant avoir un impact sur leur survie. Dans le cadre du raffinement et afin de préserver l'intégrité de leur foie, les souris PIRF seront abreuvées, *ad libitum* avec une eau de boisson enrichie en NTBC tout au long de leur hébergement dans nos locaux. L'apport en NTBC sera également assuré pendant le transport des animaux vers notre client. Les points limites seront observés tout au long du projet. Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera mis à mort selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

Pour la réalisation de ce projet, nous hébergerons et générerons au maximum 24 souris sur une durée de 5 ans. La règle de la réduction sera appliquée en produisant uniquement le nombre d'animaux requis pour les expériences.

13836 L'évaluation de la toxicologie préclinique est l'étape la plus critique du développement d'un médicament. Elle représente environ 20% du coût total du développement du médicament. Une grande partie des programmes de développement de médicaments (environ 70%) échouent en raison d'une toxicité ou de problèmes inattendus lors de la validation de phase 1 sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) chez l'homme. Dans ce contexte, l'utilisation de souris PIRF dont le foie peut être humanisé est un modèle robuste et fiable permettant d'effectuer les tests précliniques de composés candidats pour le traitement de pathologies hépatique. Dans le cadre de ces études précliniques, ce modèle de souris PIRF permet de remplacer les cellules

hépatiques murines par des cellules hépatiques humaines (hépatocytes). Ce remplacement effectué par greffe d'hépatocytes humains permet d'obtenir un modèle de souris avec un foie humanisé qui sera également utilisé pour caractériser l'efficacité de candidats médicaments visant à guérir les infections virales (hépatites) ou le cancer du foie.

A ce jour, il n'est pas encore possible de modéliser les fonctions hépatiques *in vitro*. Ni le métabolisme ni les maladies du foie ne peuvent être mimés de manière adéquate (prédiction de la réponse humaine). Il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme, le recours à un modèle animal apparaît comme la meilleure stratégie pour étudier l'efficacité et la toxicité de candidats médicaments. Dans le contexte des maladies hépatiques, la souris au foie humanisé constitue le seul modèle valable, robuste et prédictif pour tester la sécurité et l'efficacité de nouveaux médicaments.

Dans ce contexte, notre intervention aura pour objectifs de garantir la pérennité du modèle murin PIRF (stratégie de cryoconservation de la lignée sous forme d'embryons) et de garantir un statut sanitaire sain pour ces animaux (décontamination par transfert d'embryons). Les procédures de cryoconservation d'embryons et de décontamination par transfert d'embryons s'inscrivent dans le cadre de la règle des 3R. En effet, la cryoconservation est une technique qui permet non seulement de réduire l'utilisation d'animaux vivants dans les échanges de modèles entre instituts ou centres de recherche mais aussi de sécuriser ceux-ci sur la maîtrise des conditions sanitaires lors des échanges. De plus, la technique de transfert d'embryons permet l'acquisition d'un statut sanitaire de haut niveau, mais aussi de réduire de façon conséquente la part d'animaux utilisés lors de la phase d'élevage des animaux utilisés en expérimentation. Cette procédure est appliquée sur l'ensemble de nos projets. Cette technique est aujourd'hui une des bases de la maîtrise du nombre d'animaux utilisés lors de la phase de production des lots destinés à l'expérimentation.

Une fois décontaminée, la lignée PIRF sera hébergée au sein de notre structure agréée afin de produire les animaux nécessaires pour ces études précliniques. Dans le cadre de ce projet, et pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages (matériel de nidification et bâtons de bois à ronger) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Les souris PIRF dont le foie peut être humanisé présentent, en basal, des troubles hépatiques pouvant avoir un impact sur leur survie. Dans le cadre du raffinement et afin de préserver l'intégrité de leur foie, les souris PIRF seront abreuvées, *ad libitum* avec une eau de boisson enrichie en NTBC tout au long de leur hébergement dans nos locaux. L'apport en NTBC sera également assuré pendant le transport des animaux vers notre client. Les points limites seront observés tout au long du projet. Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera mis à mort selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

Pour la réalisation de ce projet, nous hébergerons et générerons au maximum 5536 souris sur une durée de 5 ans. La règle de la réduction sera appliquée en produisant uniquement le nombre d'animaux requis pour les expériences.

13837 L'angiogenèse est un processus biologique qui consiste en la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est conduit par les cellules endothéliales. Il est fondamental pour la cicatrisation des tissus et le développement embryonnaire. Cependant, l'angiogenèse aggrave de nombreuses maladies telles que le cancer et les pathologies inflammatoires chroniques. Une dérégulation de ce processus est responsable des rétinopathies. Les micro-ARN (mir) sont des petits acides ribonucléiques produits par la cellule qui ne sont pas traduits en protéines. Leur rôle est de réguler l'expression de gènes en bloquant la traduction des ARN messagers en protéines. Des études chez l'humain ont révélé la présence de plus de 500 mir différents pouvant cibler potentiellement près de 30 % des ARNm humains. Récemment, ils ont été identifiés comme régulateurs de nombreux processus biologiques et associés à diverses maladies. miR-155 est produit dans de nombreuses situations pathologiques et plus particulièrement par les

cellules du système immunitaire lors de l'inflammation et par les cellules tumorales dans le cancer. Bien que son action soit intracellulaire, la molécule circule dans l'organisme et affecte les tissus et organes. Nos travaux récents ont mis en évidence un rôle du mir 155 dans la migration des cellules endothéliales, à l'aide de différents modèles d'angiogenèse *in vitro*. Nous souhaitons à présent évaluer sa contribution au processus dans une situation *in vivo* en injectant d'une part un inhibiteur (anti-mir) pour le bloquer, et d'autre part un activateur (mir-mimic) pour le stimuler. Dans ce contexte, le projet vise à mieux comprendre le rôle de mir 155 au cours du processus angiogénique mais aussi à déterminer si cette molécule représente une cible thérapeutique pour le développement de nouvelles stratégies anti-angiogéniques. Ainsi, nous proposons de réaliser une étude *in vivo*, afin d'évaluer, l'effet du mir155 sur l'angiogenèse au cours de la vascularisation de la rétine chez la souris. Ce modèle d'angiogenèse est largement utilisé dans la communauté scientifique car il est reproductible. Il permet également de réaliser une analyse très fine de l'angiogenèse. Pour cette étude, nous prévoyons d'utiliser 41 animaux pour ces expériences (4 lots de 5 souris puis 3 lots de 7 souris). Les procédures seront réalisées par du personnel formé à l'expérimentation animale et en accord avec la règle des 3R qui préconise : le Remplacement des animaux par une méthode alternative quand cela est possible (nous souhaitons évaluer l'effet d'une activation ou d'une inhibition du mir 155 localement sur l'angiogenèse, par conséquent nous sommes contraints d'utiliser un modèle animal car seuls les modèles d'angiogenèse *in vivo* récapitulent l'ensemble des étapes du processus et permettent d'évaluer l'effet global et les éventuels effets secondaires d'un activateur/inhibiteur.) ; la Réduction du nombre d'animaux (nous allons inclure 41 animaux dans cette étude repartis en 7 groupes. Pour chaque groupe, nous avons pris en compte : (1) la difficulté d'administration locale de la molécule (intraoculaire), (2) des difficultés inhérentes à la microdissection et à la fixation des rétines néonatales et (3) de la variabilité expérimentale. D'autre part, le sexe des animaux n'étant pas un critère d'exclusion, le nombre de portée sera réduit.) ; le Raffinement favorise le comportement naturel des animaux pour éviter tout stress (nous serons, dans ce cadre, attentifs à l'enrichissement du milieu (litière, abris) mais également nous veillerons au bon comportement de la mère vis-à-vis des souriceaux. Des points limites seront établis afin d'éviter toute souffrance inutile des animaux (poche de lait, non isolement)). La procédure d'injection sera réalisée sous anesthésie locale et une médication adéquate sera administrée. Des observations fréquentes seront réalisées afin de s'assurer du bien-être des animaux.

13838 L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie sévère touchant en Europe environ 6-10 millions de patients. Les traitements actuels de l'IC sont insuffisants, contribuant à placer l'IC comme première cause de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires. Ces données représentent une forte incitation pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour l'IC, en particulier dans le domaine de l'IC dite « à fraction d'éjection préservée » (ICFEP), qui est une conséquence particulièrement grave du diabète, de l'obésité ou de la résistance à l'insuline « syndrome métabolique ».

En parallèle du système vasculaire sanguin coronaire, le cœur est irrigué par un autre système vasculaire moins connu : les lymphatiques. Le dysfonctionnement du réseau lymphatique provoque l'œdème ainsi que l'inflammation. Nos travaux récents pointent vers un nouveau type de traitement de l'IC ciblant les lymphatiques, appelé la lymphangiogénèse thérapeutique, envisagé auparavant uniquement comme un recours potentiel chez des patients atteints d'œdème périphérique. Par contre, l'impact de la lymphangiogénèse sur l'œdème et l'inflammation au niveau cardiaque en réponse au diabète et au syndrome métabolique, et ses conséquences sur la fonction cardiaque, n'ont jamais été abordés.

Dans ce projet, nous allons évaluer dans des modèles expérimentaux le rôle du drainage lymphatique au niveau du cœur dans des pathologies cardiaques dites métaboliques, associées à une ICFEP. Nous allons étudier si un dérèglement métabolique, tel que l'obésité ou le diabète, ou encore l'hypertension artérielle, ont des effets néfastes sur le transport lymphatique cardiaque, ce qui peut contribuer à l'inflammation et l'œdème cardiaque et mener à la dysfonction cardiaque. Puis, nous allons déterminer, si la lymphangiogénèse thérapeutique cardiaque pourrait limiter le

développement de l'IC associée à ces perturbations. Le but ultime de cette recherche est d'aborder pour la première fois l'hypothèse selon laquelle la lymphangiogénèse pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires. Nous espérons que cette recherche permettra la mise en place d'une nouvelle classe de traitements permettant de limiter le développement de l'IC chez des patients atteints de syndrome métabolique.

Cette recherche nécessite des expérimentations sur l'animale : 40 Souris et 380 Rats, soit 420 animaux au total pour les 5 ans du projet. Cependant pour respecter l'éthique de l'expérimentation animale, nous respecterons la règle des 3R (raffiner, réduire, remplacer), grâce aux stratégies suivantes :

1. réduire le nombre d'animaux par l'utilisation de méthodes non invasives (IRM, échocardiographie) permettant de répéter les analyses sur le même animal au cours du développement de la maladie. De plus, nous avons réalisé des tests statistiques appropriés pour calculer le nombre de souris et de rats nécessaire afin de détecter une différence de 15% (one way ANOVA et test de Tukey).

2. raffiner les modèles afin de réduire la variabilité entre animaux permettant de limiter le nombre d'animaux par groupe : ajout d'une ovariectomie minimale chez les femelles pour les rendre plus rapidement obèses et insulino-résistantes ; et ajout d'un gavage avec du sel pour déclencher une réponse aigüe de fuite vasculaire. De plus, les animaux seront hébergés aux normes requises et un enrichissement (plaques de cellulose vierge et des maisons en carton) est mis en place. Enfin, une anesthésie et une analgésie adéquates seront mises en place pour chaque animal en fonction de chaque type de procédure.

3. remplacer certaines expériences par des études *in vitro* : prolifération de cellules et interactions cellule-cellule.

13839 Le glioblastome (GBM) est la forme la plus agressive de gliomes, qui sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Les GBM sont résistants aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie, représentant une cause importante de mortalité liée au cancer. Alors que de nombreuses altérations génétiques ont été identifiées dans les GBM, on ne sait pas bien comment ces tumeurs se forment.

Les tumeurs utilisent des régulateurs clés du développement normal pour leur croissance. Le régulateur transcriptionnel Id4 contrôle la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuraux au cours du développement, et est surexprimé dans les GBMs. Le but du projet est de déterminer la fonction de Id4 dans les GBMs et dans les cellules souches neurales, les cellules d'origine potentielles de ces tumeurs.

Pour ce projet, nous utiliserons comme modèle expérimental la souris. Les cellules souches neurales sont bien caractérisées et de nombreux modèles (comme les souris génétiquement modifiées) sont disponibles pour étudier ces cellules dans cette espèce. Les données de la littérature scientifique fournissent donc une large base de connaissances permettant la préparation précise d'expériences en utilisant le minimum d'animaux.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement : la qualité du réveil sera appréciée pour détecter toute anomalie potentielle de la procédure anesthésique. Les animaux seront surveillés quotidiennement et sacrifiés dès que des points limites détaillés *infra* sont atteints. Le nombre d'animaux par cage respectera la législation sur la protection des animaux de laboratoire ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. Nous utiliserons un nombre total de 245 souris pour ce projet.

13840 Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament pendant son développement pré-clinique. Conformément à la ligne directrice " ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the

conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals ; EMA/CPMP/ICH/286/1995 ; December 2009", l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament chez un non-rongeur est indispensable pour chaque nouveau candidat médicament avant de pouvoir démarrer les essais cliniques chez l'homme, et avant toute autorisation de mise sur le marché. Selon la guideline ICH Topic S6(R1), Step 4 Note for Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Products (EMA/CHMP/ICH/731268/1998 - adopted June 2011), l'espèce primate peut même être la seule espèce pertinente pour les essais pré-cliniques des composés biologiques (protéines thérapeutiques, anticorps monoclonaux, vaccins thérapeutiques anti-cancer).

L'objectif étant de déterminer les effets potentiels du candidat médicament chez le primate, ce projet consistera donc en l'administration de ce candidat médicament par la voie prévue chez l'homme, et selon le même schéma de traitement.

Ce projet consiste en 3 procédures qui englobent toutes les études nécessaires au développement pré-clinique d'un candidat médicament chez le primate (études préliminaires, subchroniques et chroniques) dont la durée varie de 1 jour à 52 semaines (ou plus si jugé nécessaire par les Autorités). L'évaluation de la toxicité d'un candidat médicament ne peut pas être réalisée *in vitro*. Il n'existe pas de méthode alternative *in vitro* pour ce type de procédure de traitement identique à celle utilisée chez l'homme, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

Le nombre d'animaux par groupe suit les recommandations des lignes directrices et inclut le nombre minimum d'animaux permettant une analyse statistique fiable des données. Il est attendu d'utiliser au maximum 1624 macaques crabiers et 85 macaques rhésus sur la durée du projet de 3 ans. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire, sous-rétinienne ou intravitréenne, par exemple). Les doses de produit sont choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive, néanmoins, des soins adéquats seront appliqués pour éviter l'inconfort et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés dans la mesure du possible en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, perchoirs, musique).

13841 L'alimentation des vaches laitières conduit aujourd'hui à utiliser des quantités importantes (près de 3 millions de tonnes en France chaque année) de compléments protéiques comme les tourteaux d'oléagineux ou les graines de protéagineux. Ces ressources sont aujourd'hui largement importées et la réduction de leur utilisation est un enjeu de durabilité de l'élevage. Les études sur l'environnement montrent également tout l'intérêt qu'il y a à réduire leur utilisation et à accroître l'autonomie protéique des territoires d'élevage. Ce travail expérimental a donc pour objectif d'évaluer l'intérêt de nouveaux compléments pour accroître la valeur alimentaire des rations et permettre une meilleure efficacité d'utilisation des nutriments sans risques pour l'animal ni pour le consommateur tout en réduisant les intrants protéiques et leurs conséquences sur l'environnement (que ce soit pour leur production ou par leur faible valorisation par les animaux). La valeur des aliments testés sera estimée de manière totalement non invasive, contrairement aux méthodes de référence actuelles, dans des conditions de conduite proches de celle d'un élevage classique via la mesure de l'efficacité protéique (rapport entre la sécrétion de matières protéiques dans le lait et les apports en protéines métabolisables permis par la ration), ce qui constitue un raffinement important de ce domaine. Cette méthodologie, mise au point en 2017, a montré toute son efficacité à déterminer la valeur protéique de concentrés azotés avec une précision inférieure à 10%. Cet essai d'alimentation sera mené pendant une durée de 4 mois sur 20 vaches laitières en production, dans des conditions représentatives de celles rencontrées dans les élevages aujourd'hui. Ces travaux obligent à utiliser des expérimentations *in vivo* car les aliments envisagés sont systémiques (action sur les fermentations ruminales) et reposent sur une modification des mécanismes de digestion qui

sont très complexes chez les ruminants. Il n'est pour l'instant pas possible de mesurer ces effets avec des techniques de laboratoire. Les essais seront menés en carré latin pour que l'animal soit son propre témoin et pour réduire le plus possible le nombre d'animaux en gardant une puissance statistique suffisante pour montrer l'efficacité des méthodes de traitement des aliments. Le nombre de prélèvements sur les animaux sera également réduit au minimum. Ces deux derniers points permettront de répondre au principe de "réduction" des 3R. Enfin, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux suivis (ingestion, état de santé général), et toute indication de mal-être des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire, respectant ainsi le principe de "raffinement" des 3R.

13842 La sérotonine (5-HT) est neurotransmetteur pouvant se lier à différents récepteurs. Un de ces récepteurs, le 5-HT_{2B} est exprimé dans le système cardiovasculaire (cardiomyocytes, fibroblastes, poumons), où son activation a été rendue responsable d'atteintes cardiaques et respiratoires. Or cette même stimulation pourrait être utile dans des maladies du système nerveux central, comme la dépression, l'impulsivité, la psychose, ou la sclérose latérale amyotrophique. Dans un modèle murin de valvulopathie pharmacologique, il a été démontré que la perfusion de nordexfenfluramine (NdF), agoniste puissant du récepteur 5-HT_{2B}, entraîne le développement d'une valvulopathie chez les souris. Dans les mêmes conditions expérimentales, d'autres stimulants de ce récepteur ne montrent pas de toxicité cardiaque et pulmonaire. Il est donc possible que les molécules responsables de valvulopathies activent un mécanisme pathophysiologique cardiotoxique 5-HT_{2B} dépendant, et que ce mécanisme ne soit pas activé par d'autres stimulants de ce récepteur. Cette étude va donc utiliser le modèle pharmacologique de stimulation du récepteur 5-HT_{2B} dans trois modèles de souris transgéniques, n'exprimant pas trois protéines potentiellement impliquées dans la « voie cardiotoxique » de certains stimulants du récepteur 5-HT_{2B}.

A ce stade des recherches, il n'est pas possible de Remplacer cette approche *in vivo*, par une approche *in vitro*. En effet, la complexité des systèmes biologiques générant des valvulopathies (moelle osseuse, sang et cœur) nécessite une approche sur animal entier, car il n'existe pas de modèle *in vitro* capable de reproduire ces systèmes. L'animal nous permet donc d'aller étudier l'effet de nos composés sur ces différents systèmes ainsi que les interactions responsables du développement de valvulopathies. Néanmoins, nous complétons toutes ces études par des analyses de biologie moléculaire, qui orientent le choix des modèles animaux et permettent donc de Réduire le nombre de lignées transgéniques. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé selon la base des effets pharmacologiques observés et de l'hypothèse d'un effet très puissant associé à la mutation. Le nombre maximal d'animaux sera de 300. Nous avons Raffiné nos procédures de manière à limiter la chirurgie, les autres procédures étant non invasives et routinières. Lorsque nécessaire, une anesthésie et une analgésie seront utilisées. Notre laboratoire a une grande expertise de ce modèle et a déjà pu montrer que dans le délai de l'étude, aucune répercussion dommageable n'est observée, la valvulopathie étant totalement asymptomatique. Cependant les points limites généraux suivant seront vérifiés régulièrement.

Si l'un de ces paramètres est observé chez un individu, quel que soit son génotype, l'avis du vétérinaire sera demandé et les mesures adéquates seront prises en accord avec le SBEA.

13843 Notre société, prestataire de services en recherche préclinique, développe des modèles de recherche et propose un large panel de modèles *in vivo* adaptés pour des études de pharmacocinétique, de pharmacologie, d'évaluation de l'efficacité des composés thérapeutiques et pour la recherche translationnelle.

L'objectif de ce projet de recherche est de développer de nouveaux modèles expérimentaux les plus prédictifs possible afin de mimer les pathologies humaines et de tester sur ces modèles de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Dans les procédures réalisées sur les modèles animaux de cancers, les composés seront évalués dans un environnement physiologique. Cependant, les résultats de ces études ne sont pas toujours transposables à l'homme.

Pour cette raison, nous avons développé des modèles expérimentaux de souris et de rats. Une première approche consiste à xéno greffer des cellules cancéreuses ou des fragments de cancers humains directement obtenus à partir de patients, sur des animaux immunodéficients. Ces cellules ou fragments cancéreux seront soit greffés en sous-cutané, soit directement placés dans un tissu cible de la tumeur pour mieux simuler l'environnement originel du cancer. Une seconde approche consiste en l'utilisation de d'agents carcinogènes tels que la DMBA (7,12-diméthylbenz(a)anthracène) afin d'induire des tumeurs mammaires.

Quel que soit le modèle utilisé, les animaux seront traités avec de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. Les animaux seront suivis individuellement et ils seront obligatoirement euthanasiés aux points limites définis dans chaque procédure.

Ces modèles permettent de mieux évaluer l'efficacité des molécules destinées à traiter les cancers chez l'homme.

Durant les cinq années de ce projet, nous allons utiliser 125000 animaux soit 105000 souris et 20000 rats.

Ces animaux seront utilisés dans sept procédures multiples au cours desquelles seront évalués différents médicaments :

- Toxicité, pharmacodynamique, pharmacocinétique de composés thérapeutiques chez le rongeur porteur ou non de tumeur
- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée en sous cutané
- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée chirurgicalement dans différents organes cibles de la tumeur (greffe orthotopique).
- Évaluation d'efficacité anti-métastatique de composés chez le rongeur porteur de tumeur métastatique (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient)
- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur induites chimiquement par un carcinogène

Dans l'objectif de raffinement, toutes les procédures techniques sur les animaux seront réalisées selon les standards validés par la structure chargée du bien-être animal (fréquence de prélèvements de sang, les méthodes d'administration des composés...).

Chaque développement de nouveau modèle sera précédé d'une étude pilote. Pendant cette étude les experts (dont le vétérinaire) analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et ils détermineront les points limites ainsi que la stratégie du suivi clinique. Les résultats de ces études seront présentés au comité éthique.

D'autre part, pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures, nous allons utiliser des biomarqueurs et des techniques faiblement invasives d'imagerie chez le petit animal.

13844 Le porc est une espèce animale couramment utilisée dans la recherche bio-médicale lorsqu'il n'existe pas d'alternative afin d'améliorer la compréhension et le traitement de nombreuses maladies. L'utilisation de cette espèce est indispensable au progrès scientifique et médical. Cependant, l'intérêt scientifique indéniable de la recherche ne permet pas de s'affranchir des règles d'éthique et de bien-être animal sur cette espèce dotée d'une grande sensibilité. IL est donc indispensable de former les personnels. Le professionnalisme des expérimentateurs en matière de bien-être animal peut être amélioré par l'expérience accumulée et l'utilisation d'outils pédagogiques spécifiques adaptés. Outre les aspects théoriques cette formation propose l'apprentissage des gestes techniques clefs et des actions correctives éventuelles sur simulateur puis sur animal anesthésié. En effet les simulateurs dont nous disposons permettent d'affiner le geste mais ne peuvent palier aux mises en situations réelles. Si les formations sur les rongeurs sont nombreuses, il y a peu de formations sur les animaux de rente comme le porc. Cette formation a donc été conçue pour répondre aux besoins spécifiques de la communauté scientifique travaillant sur le porc. Elle a pour objectif de donner les moyens aux expérimentateurs afin d'améliorer le raffinement des

procédures pour éviter la souffrance des animaux (avec une meilleure connaissance des particularités comportementales, techniques spécifiques de contention, du stress lié à une manipulation, en diminuant ou supprimant ce stress par l'appivoisement) et de réduire le nombre d'animaux nécessaires en anticipant les besoins et le bien-être de l'animal afin d'éviter leur mort imprévue au cours d'un protocole qui serait lié à une méconnaissance des techniques zootechniques, comportementales et techniques dans cette espèce.

Outre la formation théorique sur les besoins physiologiques, comportementaux et la réalisation de procédures d'anesthésie ou de gestes techniques dans cette espèce, l'utilisation de méthodes de simulation permettra aux apprenants de s'entraîner hors animal. Puis les gestes techniques acquis au cours des ateliers de simulation seront réalisés *in vivo* sur trois porcs (1 porc pour quatre participants) afin de vérifier que les gestes sont bien assimilés en situation réelle et de pouvoir mettre en place des actions correctives éventuelles. Deux porcs seront réveillés et serviront ensuite pour les enseignements de formations continues. Le troisième porc sera mis à mort et une laparotomie sera pratiquée afin de voir le détail de certains organes puis suturés. La dépouille sera congelée et servira ensuite lors d'autres formations sur cadavre mises en place au sein de la structure afin de réduire d'autant le nombre d'animaux utilisés au cours des formations en général. A raison d'un maximum de 2 formations annuelles, le nombre total d'animaux utilisé sera de 30 porcs.

13845 Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles adoptent dans la circulation une morphologie caractéristique en forme de disque, dont le maintien dépend d'un anneau sous-membranaire de microtubules appelé bande marginale (BM). Les microtubules sont constitués de nombreuses protéines appelées tubulines qui, si elles sont anormales, peuvent être à l'origine de pathologies plaquettaires chez l'Homme. De telles pathologies se caractérisent par des défauts d'assemblage de la BM qui se répercutent sur la morphologie des plaquettes : elles ne sont alors plus discoïdes, mais sphériques, plus grosses et moins nombreuses dans le sang. Ainsi, l'objectif de notre projet scientifique est 1) d'étudier le rôle des différentes tubulines dans l'assemblage de la BM et 2) d'évaluer leur importance dans l'hémostase.

Les résultats obtenus à l'issue de l'objectif 1 présagent un rôle majeur pour deux tubulines dans les fonctions plaquettaires et l'hémostase. En effet, les souris n'exprimant plus ces deux tubulines (DKO) présentent une forte tendance hémorragique. Dans le cadre de l'objectif 2) de notre projet, nous souhaitons débiter des expérimentations visant à caractériser les processus hémostatiques de ces souris grâce à :

- 2 modèles de thrombose *in vivo* qui nous permettront d'obtenir une vision globale et exhaustive du phénomène de thrombose chez les souris DKO.
- 1 modèle dit « de Réaction Passive Inversée d'Arthus, RPIA », qui nous permettra d'évaluer l'intégrité des vaisseaux sanguins des souris DKO.
- la transfusion de plaquettes suivie d'un test de « temps de saignement », qui nous permettra d'évaluer la part imputable aux plaquettes dans le saignement des souris DKO.
- une expérience visant à remonter le chiffre plaquettaire, diminué chez les souris DKO, suivie d'un test de "temps de saignement". Elle nous permettra d'évaluer si le chiffre plaquettaire participe au phénotype hémorragique.

Nous sommes conscients que les procédures sont toutes terminales et lourdes pour l'animal, mais nous serons très attentifs à respecter la règle des trois R afin de limiter les souffrances et le nombre d'animaux utilisés, ceci dans un souci constant d'amélioration des conditions de vie et d'expérimentation. A terme, les bénéfices attendus visent à améliorer le diagnostic et le traitement des patients atteints de maladies plaquettaires

Réduction

Les modèles de thrombose *in vivo*, de maintien de l'intégrité vasculaire ainsi que les expériences de transfusions plaquettaires sont déjà maîtrisées au laboratoire, de même qu'ils sont déjà décrits et publiés dans la littérature. Ceci permet d'éviter toute mise au point utilisant des animaux

supplémentaires, et donc de réduire considérablement le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux est défini au plus près afin d'obtenir une analyse statistique (Student et ANOVA) fiable des données.

Raffinement

Une attention particulière est portée au bien-être des animaux afin de diminuer le stress et la douleur. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec des carrés de cellulose et de la frisure de papier ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie et analgésie appropriés avec maintien de la température de l'animal pendant l'anesthésie. Elles seront toujours exécutées par du personnel formé.

Remplacement

Les modèles de thrombose et de maintien de l'intégrité vasculaire permettent d'évaluer le processus physiologique complexe qu'est l'hémostase. Ils reposent sur une multitude de facteurs (vaisseaux sanguins, membranes séreuses, éléments plasmatiques) et ils ne peuvent pas être remplacés par des modèles *in vitro*, qui ne sont pas assez sophistiqués et ne nous permettent pas d'apprécier ces phénomènes dans leur globalité. Pour les procédures de transfusion, les plaquettes doivent être directement isolées de sang de souris parce que ce sont des éléments cellulaires que nous ne sommes pas capables de produire *in vitro*.

Un total de 672 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

13846 Le glioblastome est une tumeur cérébrale qui se développe à partir des astrocytes et s'accompagne d'une neuroinflammation. C'est le cancer cérébral le plus fréquent (mais restant malgré cela rare) chez l'adulte, mais aussi le plus agressif. Son pronostic reste très mauvais, l'espérance de vie étant estimée à un, voire deux ans après sa détection.

Les méthodes d'imagerie moléculaire nucléaire (notamment en tomographie par émission de positon (TEP) des tumeurs cérébrales peuvent contribuer à leur détection précoce ainsi qu'au suivi des patients après une intervention thérapeutique visant à augmenter l'espérance de vie du patient. Un certain nombre d'études (surtout précliniques) ont récemment démontré l'efficacité d'imagerie en TEP des glioblastomes en utilisant des radioligands de la protéine de translocation TSPO. La TSPO est une protéine de la mitochondrie qui n'est pas exprimée dans le cerveau sain. En revanche, son expression peut être augmentée dans certaines pathologies, telles que les tumeurs cérébrales et la neuroinflammation. Cependant son rôle dans ces phénomènes neuro-inflammatoires restent flou.

Le but de ce protocole est de suivre l'évolution d'un gliome induit par la mesure du TSPO, de la prolifération et de l'apoptose par imagerie TEP/TDMX chez la souris n'exprimant pas cette protéine (TSPO KO) et une souris contrôle (TSPO WT).

4 traceurs couplés au 18-Fluor seront utilisés pour comprendre le rôle de TSPO dans le glioblastome. Ces études seront réalisées en imagerie TEP/TDMX lors d'une étude longitudinale de 6 semaines. 30 souris balb/c seront utilisées au préalable afin de former le personnel à la réalisation de ce modèle expérimental. Au préalable une étude de biodistribution sera réalisée pour chaque traceur afin de déterminer la fenêtre d'observation optimale en imagerie.

Un total de 1480 souris maximum seront utilisées dans cette étude.

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

-Réduire: Nous n'utiliserons que 10 (étude de biodistribution) ou 20 animaux (étude glioblastome par groupe en fonction de l'étude. 10 ou 20 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité interindividuelle. 10 animaux supplémentaires sont prévus en cas de sortie d'étude prématurée. Nous utiliserons à la fois des souris mâles et femelles permettant ainsi d'optimiser les animaux issus de de l'élevage.

De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux avec des tubes en plastique, former des groupes sociaux (5 animaux par cages). Des cotons d'ouate sont déposés dans la cage afin de pouvoir fabriquer des nids. La nourriture et l'eau sont donnés ad libitum. Le cycle jour/nuit est 12/12h. Les animaux sont suivis par un personnel qualifié. La chirurgie est réalisée sous anesthésie et analgésie et un suivi post opératoire des animaux est effectué sur toute la durée de l'étude à l'aide de grille de cotation incluant des points limites.

-Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif de l'étude est de visualiser la protéine TSPO au niveau cérébral. Cette étude ne peut pas se faire sur des cellules en culture. Les résultats seront analysés statistiquement selon le test approprié.

13847 La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune générant la destruction des cellules beta à insuline et provoquant une glycémie à jeun >1.26g/l de sucre par litre de sang. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. La phase initiale de la greffe est délicate, elle se heurte à deux obstacles majeurs :

- Le faible nombre d'îlots obtenus à partir d'un pancréas et donc la nécessité de recourir à plusieurs donneurs.
- La perte cellulaire importante des îlots à l'implantation (réaction inflammatoire, stress oxydant et défaut secondaire de vascularisation).

C'est sur ce dernier point que notre projet va se concentrer et plus spécifiquement sur l'amélioration de la survie, de la fonction et de la revascularisation des îlots pancréatiques post-transplantation. En effet, une des limites majeures au succès de la transplantation d'îlots pancréatiques est leur revascularisation inadéquate après transplantation. Cette absence de revascularisation entraîne un manque d'oxygène et de nutriments participant ainsi à la perte de près de 70% des îlots injectés dans les tous premiers jours post greffe. C'est pourquoi il est essentiel de développer des stratégies pouvant potentialiser la vascularisation des îlots et donc leur survie. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à une molécule particulière naturellement sécrétée par le muscle appelé myokine. Son nom reste anonyme car un brevet est en cours de dépôt. Néanmoins, des études *in vitro* menées au laboratoire sur les îlots pancréatiques de Rat et Humain ont montré que notre myokine d'intérêt diminuait la mort cellulaire, présentait des propriétés anti-inflammatoires, améliorait la fonctionnalité des cellules pancréatiques et potentialisait les mécanismes de vascularisation. Par conséquent, au vue de ces résultats bénéfiques obtenus *in vitro*, une validation *in vivo* de notre myokine est désormais nécessaire pour finaliser sa validation pré-clinique. Ce projet *in vivo* concistera à transplanter des rats diabétiques avec des îlots traités ou non avec notre myokine et recevant ou non une injection quotidienne de cette myokine. Différents paramètres d'efficacité de la greffe seront évalués tels que la quantité de sucre dans le sang, la prise de poids, la vascularisation des îlots...Pour mener à bien cette étude et avoir des données statistiquement analysables (principe de réduction), 666 rats seront nécessaires. Raffinement: Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de préanesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Remplacement: Enfin, l'étude consiste à valider *in vivo* les effets bénéfiques de notre myokine d'intérêt sur la fonction du greffon chez un sujet diabétique en vue de développer un médicament. Ainsi, le recours à des animaux est indispensable.

13848 Le syndrome de l'intestin irritable (SII) constitue la première cause de consultation en gastroentérologie et peut toucher jusqu'à 10% de la population. Cette maladie se caractérise par des douleurs abdominales récurrentes associées à des perturbations du transit intestinal, ce qui altère la qualité de vie des patients. Bien que les traitements actuels réduisent les symptômes de motilité intestinale (constipation ou diarrhée), aucun d'entre eux ne limite l'augmentation de la perméabilité intestinale, ni ne soulage efficacement la douleur et l'hypersensibilité viscérale. Bien que l'origine de cette maladie reste mal connue, de plus en plus d'arguments plaident en faveur d'un rôle clé des protéases (enzymes permettant la dégradation des protéines) dans sa survenue.

Dans le cadre de ce projet, notre intérêt se porte particulièrement sur la Trypsine 3, une protéase à sérine (enzyme dont le site actif possède un acide aminé spécifique ; la sérine) dont l'implication est clairement établie dans le contexte de SII. En effet, l'activité de la Trypsine 3 augmente chez les sujets atteints de SII comparativement aux sujets sains. Elle contribue à l'apparition de SII en agissant à deux niveaux : i) elle active les neurones et déclenche la sensation de douleurs abdominales et ii) elle augmente la perméabilité intestinale. Au vu de ces observations, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases appelés serpinines, spécifiquement dirigées contre la Trypsine 3 semble être une approche thérapeutique à exploiter.

Certaines serpinines bactériennes ont déjà fait l'objet de recherches et ont présenté un effet inhibiteur de la Trypsine 3 *in vitro*. Le but de ce projet est d'étudier le potentiel anti-inflammatoire de ces serpinines produites par des bactéries intestinales chez un modèle de rat. En fonction des résultats que nous obtiendrons, de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les serpinines et ciblant la Trypsine 3 pourraient être adoptées pour traiter ces pathologies.

Le modèle de SII induit par le stress d'évitement passif de l'eau (ou WAS pour Water Avoidance Stress) chez le rat est l'un des modèles les plus couramment utilisés et les mieux documentés. Ce stress consiste à placer l'animal individuellement sur une petite plateforme au milieu d'un récipient rempli d'eau. Ce traitement exercé pendant 1h durant 10 jours reproduit un grand nombre des caractéristiques physiopathologiques du SII chez l'Homme (augmentation de la perméabilité épithéliale et de l'hypersensibilité viscérale) ainsi que d'autres symptômes cliniques tels que la diarrhée et l'apparition de comportements anxieux. De plus, ce modèle se caractérise par l'augmentation de l'activité des protéases, particulièrement de la Trypsine 3, ce qui explique son utilisation lors d'études antérieures sur cette maladie ainsi que lors de ce projet.

Les serpinines seront administrées par gavage aux rats pendant les 10 jours du stress d'évitement passif de l'eau (WAS). Un suivi clinique journalier sera effectué jusqu'à l'euthanasie de ces derniers. D'autres paramètres notamment l'activité de la Trypsine 3, la perméabilité intestinale et la nociception viscérale seront analysés. L'inflammation sera également quantifiée d'un point de vue macroscopique et microscopique après euthanasie par analyse d'échantillons coliques.

L'utilisation exclusive de techniques *in vitro* pour ce projet exclurait la prise en compte des différentes interactions pouvant survenir chez l'hôte, de ce fait le recours aux animaux est indispensable. Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R : remplacer, réduire et raffiner.

Remplacer : Des tests préliminaires *in vitro* ont permis de sélectionner les 3 serpinines les plus actives.

Réduire : Le nombre de rats nécessaire a été défini en se basant sur des études précédentes publiées dans la littérature scientifique, mais également grâce à un test de puissance afin d'incorporer un nombre minimum d'animaux tout en assurant l'obtention de résultats statistiques significatifs. Pour cette étude, 7 groupes expérimentaux permettant d'étudier l'effet des 3 serpinines sélectionnées seront nécessaires. Chaque groupe sera constitué de 8 rats. L'induction de la maladie par WAS concernera 6 groupes dont 3 recevront chacun une des 3 serpinines étudiées par gavage d'une souche bactérienne productrice de la serpinine d'intérêt, les 3 autres groupes constituant des témoins : 1 groupe recevra l'eau tamponnée, 1 groupe recevra une bactérie non productrice de serpinine, 1 groupe recevra un traitement de référence de SII. Le dernier groupe ne sera pas soumis à l'induction de la maladie par WAS et ne recevra aucun des éléments précités (serpinine, bactérie non productrice de serpinine, traitement de référence de SII).

Le nombre total d'animaux nécessaires pour cette procédure est de 56 rats.

Raffiner : Les rats seront hébergés par 2 dans des cages collectives. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés régulièrement (température, humidité...). Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par du papier absorbant à déchiqueter, des buchettes de bois à grignoter, des tunnels en carton pour se cacher et des tiges métalliques pour grimper. La durée d'évitement passif de l'eau (WAS) sera courte (1h/j durant 10 jours) afin de limiter le développement des lésions au strict nécessaire dans le but d'étudier le potentiel anti-inflammatoire des serpines. Au cours de l'étude, les rats seront examinés individuellement de façon quotidienne ce qui permettra de réagir le plus rapidement possible en cas d'inflammation trop invalidante.

13849 Contexte scientifique et perspectives :

Le cancer du poumon représente le cancer le plus meurtrier au monde avec 2 millions de nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à éradiquer les tumeurs pulmonaires, plus de 1,8 millions de patients décèdent du cancer du poumon chaque année. Cela s'explique en partie par la complexité des cellules composant les tumeurs ainsi que leur environnement cellulaire constitué notamment des cellules du système immunitaire. Ce dernier joue un rôle fondamental dans la lutte de la progression tumorale, mais il s'avère peu efficace car inactivé au cours du développement des tumeurs et participe même à la survie des cellules cancéreuses. Récemment, les altérations du métabolisme des cellules cancéreuses sont devenues un point clé dans l'étude de la progression tumorale pulmonaire, mais les modifications métaboliques touchant les cellules immunitaires environnantes restent peu étudiées. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra selon nous d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques plus efficaces pour traiter les cancers du poumon chez l'humain.

Objectifs du projet :

L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est d'élargir nos connaissances des voies métaboliques des cellules cancéreuses et immunitaires dans le cancer du poumon et de tester les effets de la modulation de ces différentes voies afin de diminuer la progression tumorale en ciblant directement les cellules cancéreuses ou en réactivant le système immunitaire.

Justification du modèle et analyse dommage avantage :

Les mécanismes de cancérisation à l'œuvre chez la souris sont très proches de ceux observés chez l'humain, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de ces mécanismes d'autant que l'on dispose chez la souris de nombreuses possibilités d'études au niveau cellulaire et moléculaire. Ce projet fait appel à des lignées de souris génétiquement modifiées qui ne présentent pas de phénotype dommageable. Il implique également des modèles murins de cancer du poumon qui sont bien caractérisés et modélisent fidèlement la pathologie humaine. Toutefois, nous nous intéressons à des stades précoces du développement tumoral et toutes les procédures menées avec ce modèle seront interrompues avant l'apparition de signes cliniques douloureux pour les animaux. D'autres interventions telles qu'injection, instillation et prélèvement sous anesthésie sont prévus. Assortie des mesures de réduction et de raffinement prévues qui limitent la sévérité des procédures, l'ensemble des dommages causés aux animaux sont estimés acceptables au regard des bénéfices escomptés de ce projet pour la santé humaine.

Remplacement : Le cancer du poumon est une pathologie complexe où les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires, constituant une partie de l'environnement tumoral, interagissent étroitement les unes avec les autres via de nombreuses voies métaboliques et physiologiques. De ce fait, une approche *in vivo* reproduisant ces interactions nous est indispensable pour répondre à notre problématique. Les modèles murins de cancer du poumon utilisés ici ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques.

Réduction : Nous utilisons des tests de puissance statistiques nous permettant de réduire le nombre d'animaux au strict nécessaire pour répondre clairement à notre question scientifique en garantissant la justesse des résultats obtenus. Ce projet prévoit l'utilisation de 700 souris sur 5 ans.

Raffinement : Le recours à l'anesthésie lorsque nécessaire et la mise en place de points limites précoces et adaptés à chaque procédure, basés sur une observation détaillée des animaux au cours de chaque procédure permettront de limiter la sévérité de celles-ci.

13850 Les patients diabétiques et hypertendus présentent des lésions des microvaisseaux qui causent la dégénérescence de certains organes comme les yeux ou les reins. Le diabète et l'hypertension artérielle sont d'ailleurs les deux premières causes de mise sous dialyse en Europe.

Nous avons constaté récemment que des protéines, les calpaïnes, pourraient jouer un rôle défavorable dans cette atteinte microvasculaire associée au diabète et à l'hypertension. Nous allons maintenant étudier le rôle d'une protéine bloquant l'action des calpaïnes, la calpastatine, pour voir si la calpastatine pourraient protéger de ces lésions.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales, cardiaques et rétiniennes au cours du diabète et de l'hypertension. Nous cherchons ainsi à valider *in vivo* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études *in vitro*.

En premier lieu, nous traiterons les souris à la streptozocine afin de les rendre diabétiques et nous analyserons la fonction cardiaque et rénale en réalisant des prélèvements sanguins, urinaires et par échographie. Après 10 semaines, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires. Nous utiliserons également un modèle de diabète de type II, induit par modulation génétique, sur des souris OB/OB. Enfin, nous utiliserons un modèle d'hypertension artérielle induit par la perfusion continue d'une molécule, l'angiotensine II. Chez ces deux modèles, les mêmes suivis de pression artérielle, fonction cardiaque et fonction rénale seront réalisés avant sacrifice des souris pour prélèvement et analyse des organes. Dans ces modèles nous bloquerons les calpaïnes, soit génétiquement en surexprimant la calpastatine, soit pharmacologiquement.

Le diabète et l'hypertension sont des maladies complexes et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement diabétique ou hypertensif, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales, cardiaques et rétiniennes.

La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires du diabète et de l'hypertension proches de celles de l'homme. De plus, nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées *in vitro*.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum afin de permettre une analyse statistique fiable de nos résultats. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance régulière, les procédures chirurgicales et douloureuses sont prévues sous anesthésie générale avec une analgésie préalable et des antalgiques supplémentaires seront donnés en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de 1260 maximum.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions microvasculaires au cours du diabète. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement des maladies vasculaires chez les patients diabétiques et hypertendus.

13851 Ce projet a pour objectif l'évaluation sur animaux de la toxicité non spécifique des vaccins, dérivés sanguins et sérums destinés à l'homme et de leurs composants. Ces tests de contrôle qualité sont requis pour la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes de sécurité suivant les critères définis par les exigences réglementaires. Les tests de toxicité non spécifique consistent à administrer un vaccin ou un de ses composants à des animaux et à les surveiller pendant la période nécessaire à la vérification de l'absence de toxicité. Les tests de toxicité non spécifique visent à détecter, par la mise en évidence d'une réaction anormale, une erreur de dosage, des traces d'une

substance indésirable ou une contamination microbienne. Ces tests incluent également les essais de vérification d'absence d'activité biologique anormale et l'évaluation de la tolérance des composants. Ce projet représente l'ensemble des essais menés sur les lots de produits fabriqués et composants. Les espèces employées sont la souris, le cobaye et le lapin.

Aucun signe clinique n'est attendu dans ces tests, toutefois, dans le cas où les animaux présenteraient une dégradation de l'état général, des lésions ou symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon la méthode réglementaire recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire. Le degré de sévérité est considéré comme léger à modéré pour les cobayes, léger à modéré pour les souris et modéré pour les lapins. Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 13650 souris, 8000 cobayes et 30 lapins pour une durée de 5 ans.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

En fin de test, l'ensemble des animaux utilisés est euthanasié selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique.

Mise en œuvre des 3R : Remplacement :

Il n'existe pas de méthode de remplacement des tests de toxicité sur animaux.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période. Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation et ne permet pas de réduire au-delà. Une démarche réglementaire (dossier de variation au dossier de d'autorisation de mise sur le marché) est en cours pour supprimer certains tests de Toxicité : les pays européens ont accepté cette suppression et l'arrêt des tests a lieu progressivement pour chaque produit concerné. Pour les autres pays, un processus similaire est engagé.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon des méthodes recommandées.

13852 Cas9 (CRISPR associated protein 9) est une enzyme spécialisée qui coupe l'ADN à un endroit précis. La correction des gènes mutés à l'aide de CRISPR-Cas9 est une stratégie thérapeutique prometteuse dans les maladies génétiques. Il a été montré que l'administration intracellulaire de CRISPR-Cas9 à l'aide de vecteurs synthétiques permet la modification d'un gène ciblé avec une efficacité élevée et une grande spécificité. En outre, le transfert réussi de CRISPR-Cas9 a été montré dans des cellules de l'oreille interne de souris *in vivo*.

Nous voulons appliquer cette stratégie à la rétine afin d'augmenter l'efficacité et la sécurité de la correction de gènes dans des maladies rétinienne héréditaires, et dans le présent projet au syndrome d'Usher.

Le syndrome d'Usher est la cause la plus fréquente de surdité-cécité héréditaire. Le syndrome d'Usher de type 1 (USH1) en est la forme la plus sévère ; il est caractérisé par une surdité congénitale profonde associée à une atteinte vestibulaire et par l'apparition prépubertaire d'une rétinopathie pigmentaire.

Notre stratégie consiste en l'injection intraoculaire du complexe CRISPR-Cas9 comportant une séquence oligonucléotide correctrice. Cette thérapie génique sera testée sur un modèle murin (souris) reproduisant la maladie d'Usher de type 1 après des mises au point techniques sur des souris normales.

Au total 330 souris seront nécessaires en incluant les contrôles.

Nous avons préalablement mené des études et des tests d'optimisation de notre système sur des cellules rétinienne de souris *in vitro*. Le modèle expérimental *in vivo* est cependant indispensable pour mener à bien notre étude car aucun système *in vitro* ne peut prédire l'efficacité *in vivo* des complexes testés.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse) pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R.

13853 La maladie de Huntington (MH) est une maladie génétique et neurodégénérative. La neuropathologie de la MH affecte préférentiellement le striatum, une structure sous corticale du cerveau, au stade précoce de la maladie mais peut s'étendre progressivement à d'autres structures cérébrales. Il n'existe aucun traitement curatif de la MH si bien que la maladie progresse inexorablement vers la mort.

Plusieurs modèles murins génétiquement modifiés de la MH ont été créés à des fins de recherches fondamentales et cliniques. Nous travaillons spécifiquement sur deux modèles murins afin de tester le rôle neuroprotecteur de plusieurs cibles moléculaires identifiées *in vitro* sur des modèles de neurones en culture. Ces agents neuroprotecteurs pouvant faire l'objet d'une étude clinique chez l'homme, il est tout d'abord essentiel d'établir une étude pré-clinique dans un modèle animal de la MH. L'utilisation des modèles murins génétiquement modifiés reproduisant certains symptômes et des marqueurs neuropathologiques observés chez l'homme est essentielle afin de valider ou au contraire invalider les résultats obtenus *in vitro*. L'expérimentation animale sur de plusieurs centaines de souris par modèle permettra de déterminer si les cibles thérapeutiques identifiées *in vitro* présentent aussi une action neuroprotectrice *in vivo*. Le nombre total d'animaux utilisé est fixé à 680. Des tests comportementaux locomoteurs mais aussi cognitifs sont réalisés chez les 2 modèles murins de la MH ayant reçu l'agent neuroprotecteur. Pour chaque test locomoteur et cognitif le nombre d'animaux requis est celui qui permet la réalisation d'analyses statistiques c'est à dire une dizaine d'animaux par groupe. En post-mortem, la neuropathologie est étudiée sur les cerveaux afin de préciser les effets bénéfiques des agents thérapeutiques à travers l'étude de marqueurs de la MH. Enfin, dans l'objectif de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour la MH, la non toxicité à long terme de l'agent neuroprotecteur administré à des souris doit être scrupuleusement étudiée. Pour toute ces études, la règle des 3R sera scrupuleusement respectée. Pour le remplacement, des études *in vitro* sur cellules sont utilisées dès que possible afin de tester des doses de molécules et leurs effets. Pour le raffinement, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Les cages sont enrichies par du nid. Les souris feront l'objet d'un contrôle au moins quotidiennement par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées, ou de retirer les animaux morts des salles d'hébergement. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique). Pour la réduction, l'analyse statistique des études comportementales est optimisée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'expérimentation. Les cohortes ont été mises en place de façon à réutiliser les mêmes animaux pour plusieurs analyses expérimentales.

13854 Les gliomes diffus sont les tumeurs cérébrales primitives les plus agressives chez l'adulte. En particulier, les glioblastomes sont les gliomes les plus fréquents. Alors que la génétique de ces tumeurs est relativement bien connue, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans

le développement tumoral restent mal caractérisés. Les glioblastomes présentent des caractéristiques morphologiques de cellules gliales, tels que les astrocytes et les oligodendrocytes. Nous postulons que les précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs), les cellules qui produisent la gaine de myéline, sont responsables de la croissance tumorale et représentent la population de cellules souches tumorales dans les glioblastomes. Pour tester ces hypothèses, nous proposons de : (1) déterminer si les OPCs sont requis pour l'initiation et la progression tumorale ; (2) évaluer le potentiel tumorigène des OPCs isolés de biopsies de glioblastomes ; (3) tester l'action de drogues favorisant la différenciation oligodendrocytaire (drogues pro-myélinisantes) sur le développement tumoral. Notre projet permettra de mieux comprendre les mécanismes d'oncogenèse des gliomes. Pour ces expériences, nous utiliserons la souris comme modèle expérimental.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement : la qualité du réveil sera appréciée pour détecter toute anomalie potentielle de la procédure anesthésique. Les animaux seront surveillés quotidiennement et sacrifiés dès que des points limites détaillés infra sont atteints. Le nombre d'animaux par cage respectera la législation sur la protection des animaux de laboratoire ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. Nous utiliserons un nombre total de 512 souris pour ce projet.

13855 Pour évaluer la digestibilité des matières premières et des aliments complets, le coq adulte est utilisé comme modèle pour un grand nombre d'espèces monogastriques (volailles, porcs, chiens, chats, aquaculture).

Ce modèle a été choisi car il permet de discriminer de manière sensible des matières premières ayant un profil analytique identique. Par ailleurs, le temps de transit dans le tube digestif du coq est plus court que chez les autres monogastriques, ce qui permet de réaliser une mesure rapide et sans période d'accoutumance au régime. Les mesures réalisées sont très reproductibles. De plus, il n'existe pas aujourd'hui de méthode *in vitro* permettant cette évaluation

In vivo, l'évaluation de la digestibilité consiste à faire le lien entre ce que l'animal consomme et ce qu'il digère, le restant de ce qu'il consomme étant non digéré et excrété dans les fientes. On parle de digestibilité iléale si on mesure la digestion à la fin de l'intestin grêle. On parle de digestibilité cécale lorsqu'on la mesure à la fin du tube digestif.

La digestibilité iléale est réalisée sur des coqs cecectomisés, c'est à dire que les caeca (dernière partie du tube digestif) ont été supprimés pour éviter les fermentations microbiennes qui y ont lieu. Chez le coq (et les oiseaux en général), la partie caecale du tube digestif se présente sous la forme de 2 sacs indépendants et reliés à l'iléon, ils sont donc facilement retirés lors d'une opération chirurgicale simple. Un bilan démarre par la mise à jeun des animaux pendant 24h afin que le tube digestif ne contienne plus d'aliment. Ensuite, l'ingestion précise de la matière d'intérêt permet de connaître la quantité de composants (protéine, énergie, matière grasse) ingérée, mais aussi de limiter les écarts entre animaux dus au comportement individuel. Les fientes sont collectées pendant 48h, temps nécessaire à une digestion totale, puis analysées.

Au total, 480 coqs seront utilisés pendant la durée du projet qui est de 5 ans.

L'évaluation de la digestibilité iléale et caecale de la matière d'intérêt est réalisée en 4 jours sur 9 coqs entiers (non opérés) et 9 coqs cecectomisés, suivis de 10 jours de repos. Ce nombre d'animaux a été défini comme étant le nombre minimal permettant d'obtenir des données fiables et une quantité de fientes minimale nécessaire pour les analyses chimiques. En 1 an, un animal donné sera impliqué dans 24 bilans digestifs au maximum. Les animaux sont logés individuellement afin de pouvoir récolter les fientes de chacun. Les coqs ont la possibilité de se voir et de s'entendre. Un enrichissement du milieu est réalisé par la suspension d'une ficelle avec un noeud ainsi que la présence d'un perchoir pour chaque animal.

13856 La mortalité par cancer représente un quart des causes de mortalité en Europe. Plus de 350 000 nouveaux cas de cancer sont détectés en France chaque année (plus de 200 000 hommes et de 150 000 femmes, Institut National du

Cancer, INCA), Plus de 85 000 hommes and 60 000 femmes meurent chaque année du cancer en France, ce qui en fait la première cause de mortalité masculine et la deuxième cause de mortalité féminine. Toutes les tumeurs solides se développent à partir d'un petit groupe de cellules cancéreuses en une tumeur macroscopique visible. L'angiogenèse, où croissance de nouveaux vaisseaux capillaires, artériels et veineux, est une étape critique de cette transition vers une tumeur organisée macroscopique, étape considérée comme une caractéristique essentielle du processus cancéreux. L'angiogenèse est un processus complexe impliquant plusieurs types cellulaires dans le vaisseau et des cellules dérivées de la moëlle osseuse. Même si plusieurs modèles *in vitro* simplifiés existent pour décrire une partie de ce processus (cultures de cellules tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins), ils ne peuvent récapituler l'ensemble des interactions cellulaires prenant place *in-vivo*. Pour pouvoir étudier de nouvelles cibles pharmacologiques pour le contrôle de l'angiogenèse tumorale, il est essentiel de disposer de modèles de croissance tumorale similaires avec les processus de progression tumorale chez l'homme. Notre projet utilise des modèles de croissance tumorale chez la souris pour leur similitude avec les processus cancéreux chez l'homme.

Nous avons identifié auparavant un régulateur majeur de l'angiogenèse et de la progression tumorale. Nous avons ensuite généré une lignée de cellules rapporteurs (cellules permettant d'étudier l'activation ou inhibition d'une protéine d'intérêt en fonction de la modulation pharmacologique), ce qui a permis de cribler des inhibiteurs pharmacologiques potentiels. Les inhibiteurs ont baissé le taux d'activité dans ces cellules, reflété par la diminution du rapporteur. Nous avons identifié plusieurs inhibiteurs pharmacologiques *in vitro*. Nous avons testé leur capacité à inhiber l'angiogenèse *in vitro*. Nous avons identifié 10 molécules et testerons leur potentiel d'inhibition de l'angiogenèse et de la progression tumorale chez la souris *in vivo*.

Dans un souci de remplacement, les cibles visées dans le présent projet ont préalablement été identifiées dans des modèles *in-vitro*. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisé, le nombre d'animaux pour chaque expérience sera limité à celui nécessaire à la validation d'un effet significatif. Par ailleurs, le projet sera conduit en plusieurs étapes conditionnelles, dans lesquelles seule l'obtention de résultats pour un premier type de tumeur conduira à la réalisation de l'ensemble des expériences associant des modèles tumoraux complémentaires. Dans un souci de réduction, les mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les études de croissance tumorale et la réalisation des analyses histologiques et moléculaires. Ce projet utilisera au maximum 1000 souris adultes. Dans un souci de raffinement, des points limites précoces et adaptés à chaque modèle tumoral seront évalués quotidiennement pour limiter autant que possible la souffrance potentielle des animaux.

13857 La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une cause majeure de morbidité et de mortalité partout dans le monde. La BPCO est une limitation persistante du flux d'air dans les voies aériennes, généralement progressive et associée à une réponse inflammatoire chronique des voies respiratoires et des alvéoles pulmonaires. L'exposition chronique à la fumée de cigarette est le facteur de risque principal contribuant à la pathogénèse de cette maladie. Les nouveaux systèmes de délivrance de nicotine (ENDS) sont commercialisés comme étant des « produits non ou moins nocifs » et leurs défenseurs invoquent le bénéfice de ces systèmes pour permettre la réduction du tabagisme et, en conséquence, la diminution des pathologies liées au tabac. Cependant, les premières études scientifiques sur les ENDS évoquent des produits dangereux du fait de la présence de nicotine et d'arômes pouvant être pro-inflammatoires et pro-oxydants. D'autres études montrent peu de toxicité après exposition aiguë, mais l'effet de l'exposition chronique reste peu connu. Des résultats préliminaires identifiant les effets de la cigarette classique et des principaux composants de l'e-vapeur des ENDS sur un modèle cellulaire en 3D mimant la barrière alvéolo-capillaire ont été réalisés. La perte de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire accompagnée de processus inflammatoires et pro-oxydants est caractéristique de la BPCO. Ainsi, une étape cruciale

dans notre projet est le modèle murin qui est prometteur pour décrire la physiopathologie de cette maladie.

Le but global de ce projet est de valider l'effet de la cigarette sur le système respiratoire et ses conséquences sur les fonctions cardiaques et de comparer ainsi l'effet des ENDS récemment commercialisés et voire si leur effet est plus ou moins néfastes que la cigarette classique.

Dans cette étude, nous validons dans un premier temps le modèle animal par exposition à la cigarette classique. Une fois validé le système sera utilisé pour voire l'effet respiratoire et cardiopulmonaire chez la souris exposée de manière chronique aux nouveaux dispositifs délivrant la nicotine (ENDS).

Remplacement: une modélisation de la barrière alvéolo-capillaire *in vitro* sur des modèles cellulaires a été réalisée pour sélectionner les différentes possibilités d'exposition et les dispositifs délivrant la nicotine. Le modèle souris reste crucial et permet d'étudier de manière complète le système pulmonaire et cardiaque, tel qu'il peut être affecté chez l'Homme. La possibilité de modification génétique reste prometteuse pour décrire la physiopathologie de la BCPO

Réduction: Dans ce projet, nous comptons utiliser 216 souris. Nous avons au préalable mis en place et validé un modèle cellulaire d'exposition aux différents dispositifs délivrant la nicotine. Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser dans partie de notre projet, nous avons identifié les principaux mécanismes physiopathologiques induits par les différentes possibilités d'exposition et ces mécanismes seront la cible de nos travaux *in vivo*

Raffinement: les animaux seront hébergés dans des conditions de stabulation optimales et avec un milieu enrichi. L'état de santé général des souris est suivi tous les jours. Il consiste dans le suivi du poids, de la pression artérielle, de la vie en groupe (en respectant la hiérarchie et l'intégration des nouveaux animaux), de la présence de blessures par morsure ou d'autres lésions externes. Pour certain test comme l'échographie, les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane et un suivie post-anesthésique des animaux est réalisé en les mettant dans une cage chauffé et aéré.

13858 CONTEXTE

En 2018, environ 382 000 nouvelles personnes ont développé un cancer en France, et 157 400 en sont décédées. Aujourd'hui, 1 malade sur 2 guérit du cancer, mais le pronostic est très variable d'un patient à l'autre : il dépend notamment du tissu touché, du stade du cancer au moment du diagnostic, de la présence ou non de métastases, de la génétique du patient.

Les traitements à base de chimiothérapie présentent de nombreux effets secondaires lourds. Il reste primordial d'établir des solutions anti tumorales mieux tolérées. Une alternative à la chimiothérapie est la stimulation du système immunitaire.

Pour cela il est proposé ici d'utiliser le LPS (Lipopolysaccharide, issu des membranes externes de certaines bactéries), qui est un puissant immunostimulant des cellules du système immunitaire inné. L'administration intraveineuse chez l'homme a été tentée dans le contexte de la cancérologie avec une forte toxicité mais reste néanmoins une voie thérapeutique intéressante en cancérologie, particulièrement dans le cadre du développement des immunothérapies de dernière génération.

Une formulation moins toxique du LPS (lipo-LPS) a démontré une forte activité antitumorale chez des modèles rongeurs. Une problématique importante pour le développement de ce composé en clinique est la tolérance lors de l'administration intraveineuse dans la mesure où le LPS est responsable de manifestations septiques (fièvre, chute de tension). Une étude menée chez le lapin (espèce très sensible au LPS) a permis de déterminer une dose non toxique très supérieure à celle du composé conventionnel. Cette dose sera utilisée chez le porc pour évaluer l'innocuité du traitement dans une deuxième espèce de mammifère non rongeur.

OBJECTIF :

Les objectifs de ce projet sont :

- Tout d'abord de mettre au point un modèle porc dans une procédure préliminaire,
- Ensuite de comparer les manifestations septiques induites par le LPS et le lipo-LPS

TYPE PROJET/ANIMAUX

Ce projet de recherche translationnelle sera composé de 2 procédures, LA PREMIERE sans réveil mettant en œuvre 1 porc PUIS LA SECONDE, MODEREE, METTANT EN ŒUVRE 8 PORCS.

Les animaux recevront une injection intra veineuse de LPS ou lipo-LPS et seront observés en continu pendant les deux heures suivantes, période au cours de laquelle vont se manifester les réactions septiques.

REGLE DES 3R

Les points limites seront déterminés sur des limites de constantes à ne pas dépasser. Les anesthésies sont effectuées sans contention (prolongateur entre seringue et aiguille). 8 PORCS SERONT REUTILISES AFIN DE REpondre A DEUX CONDITIONS CE QUI PERMET DE REDUIRE LE NOMBRE D'ANIMAUX DE 17 A 9.

13859 La Sclérose en Plaques (SEP) est une pathologie démyélinisante qui se déclare chez les jeunes adultes, et se manifeste par des réactions auto-immunes ciblant la myéline, menant à l'apparition de troubles neurologiques très handicapants. Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de guérir cette maladie ou de réparer les dommages causés. L'étude de la SEP *in vivo* est réalisée sur des modèles rongeurs trop éloignés de l'Homme pour permettre d'aborder la physiopathologie de la maladie, et le développement de stratégies thérapeutiques cliniquement pertinentes. Nous avons établi chez le macaque, un modèle lésionnel du nerf optique dans le but de mieux cerner l'impact fonctionnel de la démyélinisation – remyélinisation sur les fonctions visuelles. Des tests fonctionnels (PEV : potentiel évoqué visuel, PLR : reflex pupillaire, ERG : électrorétinogramme), utilisés en clinique humaine, sont effectués avant et après lésion, pour étudier l'impact et l'évolution de la démyélinisation du nerf optique. Ils sont ensuite corrélés avec une évaluation post-mortem de la lésion du nerf optique et des conséquences de cette lésion au niveau de la rétine. Pour réduire le nombre d'animaux à 12, nous réalisons des tests comportementaux sur des créneaux courts (< 1h10) et quotidiennement, afin d'amasser suffisamment de données significatives pour l'exploitation statistique et le suivi longitudinal. Notre objectif est d'exploiter ce modèle pour étudier l'effet pro-myélinisant de la Clémastine (traitement par voie orale) sur la lésion de démyélinisation. Chaque intervention sera accompagnée d'un protocole d'anesthésie et d'un accompagnement analgésique adapté pour réduire la douleur et éviter toute souffrance prolongée de l'animal. Un opérateur atitré prendra soin des animaux quotidiennement pour limiter leur angoisse et détecter tous comportements anormaux. Cette étude validera l'intérêt de ce nouveau modèle de démyélinisation avec déficit fonctionnel, très proche de l'Homme, pour le développement de stratégies thérapeutiques. Elle permettra de démontrer l'intérêt d'une approche pharmacologique basée sur une molécule pro-myélinisante pour prévenir les troubles définitifs chez les patients SEP. Elle pourrait d'autre part contribuer à la mise en place de nouvelles méthodes de diagnostic précoce des atteintes du système visuel, facilement transposable à l'Homme.

13860 La surdité DFNB9 est une surdité profonde héréditaire causée par une mutation dans le gène OTOF codant pour l'otoferline. Il n'existe aucun traitement curatif de cette surdité seulement une possibilité d'implantation cochléaire dont l'efficacité est partielle. Des résultats, obtenus chez la souris ne possédant pas l'otoferline, indiquent que cette surdité pourrait être corrigée par thérapie génique (par injection d'un vecteur porteur du gène de l'otoferline). Ces résultats, bien que très encourageants, ne permettent pas d'envisager immédiatement des essais chez l'Homme (essais cliniques) car certaines caractéristiques du modèle murin comme la taille et le développement de l'oreille interne ainsi que les fonctions des gènes chez la souris diffèrent significativement de ceux des humains.

De par nos travaux antérieurs, le modèle primate non-humain apparaît comme le plus adapté pour l'étude des pathologies auditives. En plus des correspondances anatomiques et fonctionnelles, le modèle de primate non-humain permet aussi de tester la faisabilité d'une injection locale équivalente à celle qui serait pratiquée chez l'Homme. Certains aspects portant sur l'administration

par voie chirurgicale, et la technique de prélèvement et d'analyse de l'os cible (l'os temporal) ont déjà été validés à l'aide de tests *ex vivo*.

Nous souhaitons donc, recourir à un modèle animal dont les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de l'ouïe sont les plus proches de celles chez l'Homme pour tester et optimiser la spécificité et la sécurité des virus ayant donné des résultats prometteurs dans le modèle murin. Nous souhaitons également établir le protocole d'injection dans l'oreille interne qui pourra ensuite être utilisé à l'identique chez l'Homme pour réaliser des traitements médicamenteux de l'oreille interne qui n'existe pas aujourd'hui, en particulier de thérapie génique.

Pour cela nous utiliserons des techniques électrophysiologiques couramment utilisées pour explorer l'audition humaine, par exemple les potentiels évoqués auditifs (PEA) mais également des techniques histologiques après prélèvement des os de l'oreille (os temporaux). Les PEA permettent d'obtenir le niveau auditif des animaux de façon non-invasive. Une imagerie par résonance magnétique (IRM) de l'oreille sera réalisée avant l'euthanasie afin de corréliser l'atteinte en imagerie à l'atteinte histologique. L'ensemble de ces travaux nécessitera un total de 18 primates non humains, nés et élevés en captivité dans des établissements autorisés. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats.

Toutes les interventions de chirurgie et d'imagerie sur les animaux se feront sous anesthésie générale, renforcée si nécessaire par des compléments de médicaments anti-douleurs appropriés. La mise en œuvre d'un suivi dans le temps non invasif (imagerie *in vivo* et tests électrophysiologiques sur animaux anesthésiés) permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites ont été prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Si tel était le cas, le vétérinaire de l'installation serait alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

13861 Le projet du laboratoire est de participer à la compréhension des mécanismes régulant la mise en place, le maintien et la fonction des cellules endocrines (sécrétrices d'hormones) du pancréas et de l'intestin. Ces cellules sont générées au cours du développement à partir de cellules dites progéniteurs qui vont se différencier et donner des cellules endocrines matures et fonctionnelles. Au cours du développement, la différenciation de ces progéniteurs fait l'objet d'une régulation très fine et complexe, impliquant aussi bien une communication entre les différents organes, que des processus inter- et intracellulaires.

De nombreuses questions demeurent encore sans réponse dans cette régulation, notamment les mécanismes permettant de déterminer de manière très précise la fonction, le maintien et le devenir des cellules endocrines indispensables à la régulation du métabolisme énergétique.

Les cellules endocrines pancréatiques sont regroupées en structures, nommées îlots de Langerhans. Elles produisent notamment l'insuline (cellules beta) et le glucagon (cellules alpha), hormones antagonistes qui régulent la glycémie, et dont l'altération est à l'origine du diabète.

Les cellules endocrines de l'intestin, appelées cellules entéroendocrines (EE) sont, elles, dispersées dans l'épithélium intestinal et participent également à la régulation de la glycémie notamment grâce aux cellules L produisant du glucagon.

La compréhension des mécanismes responsables de la formation et du maintien des cellules endocrines est indispensable au développement de thérapies, notamment contre le diabète.

Dans cette étude, nous souhaitons utiliser des modèles de souris portant des mutations affectant spécifiquement les cellules productrices de glucagon afin d'effectuer des analyses du métabolisme (dosage de la glycémie, tolérance au glucose, réponse à l'insuline), des analyses histologiques, mais également de révéler des réseaux de gènes impliqués dans ces régulations grâce à des analyses du transcriptome. Nous utiliserons pour cela 130 souris en une période de 5 ans.

Remplacement:

Nous avons déjà réalisé des expériences *in vitro* avec des lignées cellulaires. Le travail avec ces lignées ne permet pas de reproduire l'environnement physiologique, les interactions inter-organes

etc. C'est pourquoi l'étude d'un organisme entier est nécessaire et nous permettra de réaliser des analyses dans des conditions physiologiques notamment avec des stimulés alimentaires tels que le glucose. Par ailleurs, la génétique de la souris est bien connue et nous permet d'inactiver le gène d'intérêt uniquement dans les cellules étudiées.

Réduction:

Tout est mis en place afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées lors des expérimentations, tout en nous permettant de rester dans des conditions de bonne exploitation statistique des résultats et leur publication. Le nombre d'animaux par lot est calculé pour palier à la variation entre les animaux et observer une population représentative du phénotype.

Raffinement:

Aussi bien pour l'élevage que pour les expérimentations, les protocoles appliqués tiennent compte du bien-être des animaux et visent à minimiser la douleur ainsi que le stress des animaux.

Les souris qui participent à plusieurs tests auront au minimum 15 jours de phase de repos entre chacun de ces tests pour garantir la pleine récupération de l'animal.

13862 Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes des déficiences intellectuelles dans la trisomie 21 (T21). La T21 est due à la présence d'un chromosome 21 en plus. Elle touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de pathologies associées dont des anomalies cardiaques. Il y a 5000 nouveaux cas de cardiopathies congénitales par an en France pour 800 000 naissances dont 10% sont associée à la trisomie 21 (50% des enfants trisomiques 21 ont une cardiopathie). C'est donc un enjeu majeur pour la prise en charge chez les patients.

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

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

Ce nouveau modèle sera analysé du point de vue cardiologique grâce à l'électrocardiographie (ECG). C'est une représentation graphique de l'activité électrique du cœur. C'est un examen rapide, indolore et non invasif. L'activité électrique est recueillie par des électrodes à la surface de la peau. Les études de l'ECG permettent d'avoir une idée en 3 dimensions de l'activité électrique du cœur et permet de mettre en évidence des cardiopathies. Si le modèle est porteur de pathologie cardiaque, les objectifs futurs seront d'en comprendre les origines physiologiques et développementales et d'identifier les voies moléculaires perturbées. Le modèle pourra également servir pour tester de nouvelles voies thérapeutiques comme preuve de concept avant une application chez l'homme.

Règle des 3R :

Remplacement : Les cardiopathies chez les patients T21 prend son origine très tôt au cours du développement embryonnaire. La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires

ainsi que les origines développementales de la pathologie requièrent l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité et il n'existe donc pas de méthode autre que l'étude *in vivo*. D'autre part, la souris est une espèce physiologiquement et génétiquement assez proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques pour obtenir ces modèles de pathologies humaines.

Réduction : En général, 2 cohortes de souris (15 trisomiques mâles et 15 contrôles) sont requises pour une analyse cardiologique complète. La totalité de ces expériences nécessiteront donc l'utilisation de 30 souris. Ce nombre est basé sur une analyse statistique prospective, en fonction de notre expérience pour atteindre des résultats exploitables de manière statistique. A l'issue de ces tests, les animaux seront euthanasiés pour des analyses histologique et moléculaire du cœur.

Raffinement : le test de recherche d'anomalies cardiaques se déroule sous anesthésie gazeuse générale et n'est pas invasif, il n'entraîne pas de souffrance sévère pour l'animal mais nécessite une immobilité. Les animaux seront maintenus sur tapis chauffant jusqu'à leur réveil pour éviter l'hypothermie. Cependant, comme le suivi du bien-être animal est primordial pour le bon déroulement des analyses, les animaux feront l'objet d'une observation le jour et le lendemain de l'anesthésie pour s'assurer de leur bien-être et de leur santé et une prise en charge adaptée sera effectuée en cas de signe de douleur.

13863 Les cellules de la couche intermédiaire des artères (la media) sont appelées cellules musculaires lisses vasculaires. Leur multiplication anormale participant à l'obstruction progressive de la lumière artérielle est appelée l'hyperplasie intimale. Cet événement peut être associé à des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de ce processus ne sont pas complètement élucidés. Cela complique ainsi la prévention de ce risque pathologique. Un certain nombre de facteurs de croissance et de cytokines ont été identifiés comme jouant un rôle dans ce processus. Parallèlement, des constituants de la matrice extracellulaire qui entoure les cellules sont également susceptibles d'influencer la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. C'est le cas d'une protéine de l'hémostase, le facteur von Willebrand. Il participe à l'adhésion des plaquettes sanguines intervenant après une lésion vasculaire lorsque la couche interne de la paroi artérielle (l'endothélium) a disparu. Il est produit par les mégacaryocytes (les cellules qui produisent les plaquettes) et les cellules de l'endothélium ; ces dernières représentant la principale source du facteur von Willebrand circulant dans le sang. Diverses études ont décrit un lien entre le facteur von Willebrand et les cellules musculaires lisses vasculaires. Par exemple une déposition de von Willebrand sous l'endothélium a été observée dans différentes conditions telle que l'athérosclérose.

Dans ce contexte physiopathologique, nous nous intéressons d'une part à l'implication du facteur von Willebrand dans le développement vasculaire normal, et d'autre part, aux mécanismes pouvant expliquer le rôle du facteur von Willebrand dans la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Les résultats préliminaires de nos collaborateurs ont montré une accumulation du facteur von Willebrand à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires et un effet sur leur prolifération.

Notre projet a fait l'objet d'une publication dont nous avons eu le retour des référés avec possibilité de répondre à leurs questions. Nous avons observé moins de prolifération chez des souris ayant peu de facteur de von Willebrand par rapport à des souris contrôles. L'un des référés souhaite que l'étude soit complétée par un modèle de ligature totale de l'artère carotide pour être plus proche des pathologies humaines.

La ligature de la carotide droite se fera sous anesthésie (isoflurane) et injection de lurocaïne. Si besoin (par la présence de signe de douleurs dans les 6 heures qui suivent l'opération), une injection de lurocaïne sera réalisée. Le protocole durera 4 semaines post-chirurgie. A la fin du protocole, après mise à mort, la carotide sera prélevée pour étudier la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Le nombre d'animaux par groupe est réduit à son maximum en respectant les contraintes de publication, sans compromettre les objectifs du projet et pour permettre de bonnes analyses

statistiques. Pour limiter le nombre d'animaux nous utiliserons pour chacun d'eux leur carotide commune gauche comme vaisseaux contrôle. Les études statistiques antérieures ont montré que des groupes de 8 à 10 animaux sont en moyenne requis pour obtenir une distribution normale des mesures.

Une observation quotidienne des animaux en expérimentation sera réalisée. L'état général de l'animal sera évalué : prise de nourriture, et mouvements habituels sont considérés comme des signes de bonne santé. La douleur sera évaluée par les signes de prostration, de perte d'appétit ou de poids et de mouvements pénibles.

Si un animal présente un amaigrissement associé à une prostration ou un comportement anormal, il sera sorti du protocole et mise à mort après endormissement.

- Pour le raffinement, les animaux ne seront pas manipulés dans la même pièce que celle où ils sont hébergés. Les souris seront hébergées de 2 à 5 par cages individuellement ventilées. Elles seront nourries ad libitum avec les croquettes. La litière sera changée une fois par semaine. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

Il est prévu d'utiliser 40 souris au total (deux séries de 20 par groupe contrôles et mutées)

13864 A l'heure actuelle, l'étude des réseaux neuronaux s'avère être difficile du fait de l'absence de méthode permettant de mesurer simultanément l'activité et la connectivité neuronale. Au niveau de la rétine, un des défis majeurs serait d'être capable de mesurer l'activité de cellules ciblant la même aire visuelle dans le cerveau.

Les outils actuellement disponibles donnent de bons résultats pour des études strictement anatomiques, mais ne sont pas compatibles avec les nouveaux outils génétiques disponibles permettant l'enregistrement de l'activité cellulaire.

L'identification d'un vecteur viral qui permettrait de retracer la connectivité sans toxicité serait très intéressant pour les études de la fonctionnalité rétinienne. Comme préalable, nous savons que les vecteurs viraux de type adéno-associés (AAV) permettent le transport de molécules le long des axones du cerveau mais de manière insuffisamment efficace pour le transport des protéines nécessaires aux études simultanées de l'activité et de la connectivité rétinienne.

Dans ce projet, nous proposons de développer de nouveaux variants d'AAV optimisés pour le transport axonal entre la rétine et le cerveau et entre le bulbe olfactif et le cerveau.

Pour cette étude nous utiliserons des souris normales ainsi qu'une lignée de souris transgéniques qui permet une expression ciblée des vecteurs au niveau des neurones.

L'efficacité de nos nouveaux vecteurs sera analysée après euthanasie de l'animal sur des échantillons de cerveau par des techniques de biologie moléculaire et d'histologie.

Au total, 240 animaux seront nécessaires à cette étude.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe pour les injections intraoculaires et intranasales des vecteurs viraux et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les études *in vitro* qui peuvent l'être ont déjà été effectuées.

13865 A partir de l'observation, chez une jeune femme de 36 ans, d'une association inhabituelle de maladies graves (un cancer du sein, un syndrome myéloprolifératif de type Vaquez, et une polyarthrite rhumatoïde), nous avons fait la preuve du concept d'une approche individuelle en génétique constitutionnelle.

Pour notre patiente, nous avons deux échantillons pathologiques: un fragment de son cancer du sein et un prélèvement de moelle osseuse. A l'aide d'une nouvelle technologie d'analyse génomique, nous avons identifié une mutation de l'oncogène cMET. C'est une mutation constitutionnelle, retrouvée dans l'ADN de la patiente et dont la valeur pathologique n'était jusqu'alors pas connue. Nous avons établi un modèle de transgénèse non dommageable pour cette mutation de c-MET chez des souris de fond génétique C57bl/6. La caractérisation phénotypique détaillée des animaux a mis en évidence le développement de syndromes auto-immuns (polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Sjögren), et de syndromes myéloprolifératifs, semblables à ceux observés chez la patiente. Cependant, les phénotypes restent peu sévères et n'altèrent en rien la survie des animaux.

L'objectif de ce projet est poursuivre l'étude de ce modèle et de reproduire le plus fidèlement possible la pathologie humaine sur 2 axes:

- La survenue de ces pathologies trouvant souvent leur origine dans des processus multifactoriels, nous voulons dans un premier temps déterminer l'impact de facteurs additionnels sur l'aggravation du phénotype des animaux. Cette objectif sera atteint par l'injection de 2 composés, l'un permettant d'induire une inflammation, et l'autre se liant spécifiquement à cMET. La sévérité se traduira par l'observation d'un gonflement au niveau des articulations.

- Ce travail ouvre par ailleurs des perspectives thérapeutiques pour l'utilisation de molécules anti-MET dans le traitement des polyarthrites rhumatoïdes, des syndromes myéloprolifératifs. Aussi, nous étudierons l'efficacité de traitements ciblés anti-MET sur nos modèles. Cette partie du projet se fera sur notre lignée traitée de la même manière que dans le point précédent, auquel nous adjoindrons un traitement ciblant cMET.

Ce travail propose d'étudier des pathologies très diverses dont l'élément clé serait la mutation du gène MET pour lequel nous avons déjà un modèle animal pertinent, qui reproduit la pathologie humaine et sur lequel nous pouvons étudier les facteurs d'aggravation et de traitement des phénotypes. Les modèles d'étude in-vitro sont limités et peu pertinent dans ce cas de figure exceptionnel. Par ailleurs, le nombre d'animaux nécessaire a été calculé au minimum pour nous permettre d'atteindre les objectifs fixés. Ce nombre est porté à 144 souris. Concernant le raffinement, les actes de ponctions de moelles seront réalisés sous anesthésie générale. Un suivi quotidien des animaux est assuré par les membres de l'animalerie et le personnel formé de l'unité. Pour assurer le bien-être des animaux, les souris sont placées en groupes sociaux et dans des cages avec enrichissement. Des points limites précoces ont été fixés pour limiter la gêne et la souffrance éventuelle des souris.

13866 Thème de recherches : Etude des cellules immunitaires dans l'asthme allergique, suite à l'invalidation *in vivo* du gène d'intérêt.

Mieux comprendre les mécanismes contrôlant les fonctions des cellules immunitaires (lymphocytes T) est un enjeu majeur pour la modulation de la réponse immunitaire à des fins thérapeutiques. Les lymphocytes T effecteurs jouent un rôle critique dans l'établissement et la régulation d'une réponse immunitaire efficace dans le cas d'infections, d'allergies ou au cours du développement tumoral. Dans une étude antérieure nous avons mis en évidence l'implication du gène d'intérêt dans une population de cellules lymphocytaires effectrices comme régulateur de l'immunité anti-tumorale dans le cancer colorectal. Cette population cellulaire joue un rôle prépondérant dans l'asthme allergique et aucun projet montrant l'implication du gène d'intérêt n'a été fait, cela permettrait d'étudier son rôle fonctionnel dans ce processus pathologique fortement dépendant de ces cellules et pourrait donner lieu à de nouvelles voies thérapeutiques. Nous souhaitons pour cela recourir à un modèle murin invalidé pour le gène d'intérêt et exposer ces animaux à des allergènes, afin de mimer des situations d'asthme allergique permettant ainsi d'étudier l'implication de ce gène dans ces processus de réponses immunitaires.

La compréhension des mécanismes responsables de la production et des fonctions des cellules immunitaires est importante pour différentes problématiques de santé publique. Les cellules immunitaires sont produites tout au long de la vie d'un individu de façon continue afin d'assurer leur

renouvellement et apportent une réponse adaptée que ce soit en situation d'homéostasie ou pour faire face à des agressions par des agents étrangers. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de recherche qui vise à étudier un nouveau régulateur des cellules immunitaires dans le contexte d'asthme allergique en utilisant un modèle de souris mutantes développé précédemment.

Afin de s'inscrire dans la logique des 3Rs (Réduction du nombre d'animaux utilisés, Raffinement des procédures expérimentales, Remplacement des animaux), chaque procédure expérimentale *in vivo* envisagée, a fait l'objet d'études préliminaires permettant d'optimiser au mieux le nombre d'individus utilisés. Pour préserver au mieux le bien-être animal nous avons défini des points d'arrêt anticipés des expériences et utiliserons systématiquement la plus faible dose d'allergène entraînant une réponse d'asthme allergique. Le remplacement par substitution n'est actuellement pas envisageable, aucun modèle cellulaire *in vitro* ne permet de mener les études proposées, puisque ces mécanismes impliquent des micro- et macro-environnements cellulaires, incluant de nombreux types cellulaires. C'est pourquoi ce projet de recherche ne peut se faire qu'en utilisant la souris comme modèle d'étude afin de comprendre les mécanismes d'activation des cellules immunitaires en absence du gène d'intérêt en condition d'asthme allergique. Les résultats de ces travaux devraient contribuer à optimiser les traitements chez les patients.

Dans les différentes expérimentations, la détermination sexuelle étant importante, les souris des 2 sexes pourront être utilisées, mais indépendamment. Ces études nécessiteront au maximum l'utilisation de 522 animaux pour l'ensemble du projet.

Ce projet est composé de 2 procédures expérimentales visant à étudier, en absence du gène d'intérêt, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'asthme allergique aiguë ou chronique.

13867 L'activité physique est déconseillée dans le cas des maladies neuromusculaires car on craint qu'elle soit néfaste. En effet des contractions intenses peuvent rapidement provoquer des lésions du muscle squelettique dystrophique, qui peuvent se traduire par une diminution de la force maximale, une perte de l'intégrité de la fibre musculaire. Toutefois, il est possible que l'activité physique chronique n'exerce pas d'effet néfaste dans le cas d'un modèle murin de maladie neuromusculaire, la souris mdx qui est utilisé comme modèle de la maladie de Duchenne de Boulogne (DMD). L'objectif 1 est de poursuivre l'analyse des effets de l'activité sur les muscles squelettiques de modèles murin de la DMD (mdx, dba2-mdx, dko mdx-desmine).

Par ailleurs, d'autres thérapies "classiques" (pharmacologique ou génétique) sont en cours d'études, au stade préclinique ou non. Certaines d'entre elles semblent prometteuses bien que pour l'instant ne permettent pas de "réparer" parfaitement le muscle malade. L'objectif 2 est d'étudier les effets combinés de l'exercice et de la thérapie classique, afin de savoir si les effets bénéfiques de l'exercice et de la thérapie classique peuvent s'additionner ou au contraire si l'exercice est néfaste dans le cas d'une thérapie classique.

Nous étudierons 480 souris au total, avec 3 lignées de souris de modèles de maladies neuromusculaires (mdx, dba2-mdx, dko mdx-desmine), 4 conditions d'exercice physique (course sur roue, course sur tapis roulant, surcharge mécanique, inactivité), 4 groupes de souris par condition d'exercice (sedentaire, sedentaire+thérapie, exercice, exercice+thérapie), 1 thérapie (ciblant la mutation, à l'aide d'un transfert de gène dans le muscle), et 10 souris par groupe. Cette recherche est basée sur l'utilisation de souris, car il n'est pas possible de réaliser cette étude sur des cellules (exercice). Leur nombre a été calculé au plus juste en fonction de l'analyse statistique. Le milieu dans lequel est élevé les souris est enrichi et toutes les mesures sont prises afin d'éviter leur souffrance, donc en respectant la règle des 3Rs (remplacement, réduction et raffinement).

13868 L'autophagie est un processus permettant aux cellules de dégrader et recycler leurs composants endommagés. La machinerie autophagique est constituée de protéines ATG (autophagy-related genes). Outre son importance dans la survie en conditions de stress cellulaire (cellules à longue durée de vie, radiations, privation de nutriments), l'autophagie joue un rôle dans les réponses immunitaires. A ce titre, la modulation de l'autophagie est donc considérée comme une voie thérapeutique intéressante pour certaines maladies inflammatoires, notamment pour le lupus

érythémateux systémique où l'exposition aux rayonnements UV est un facteur déclenchant de la pathologie. Ainsi, moduler l'autophagie pourrait permettre de limiter l'inflammation cutanée au cours de cette pathologie ou d'autres.

Les cellules de Langerhans (LCs) de l'épiderme sont des cellules immunitaires sentinelles, capables de détecter par exemple les infections cutanées. Elles se caractérisent par des caractéristiques uniques (auto-renouvellement, demi-vie exceptionnellement longue et résistance à l'irradiation gamma). Nous avons généré une lignée de souris présentant une déficience en ATG5, une protéine-clé du complexe autophagique, dans les LCs. Nos résultats montrent qu'une déficience en autophagie n'affecte pas l'installation de LCs dans l'épiderme, mais qu'elles disparaissent rapidement avec l'âge. Nous souhaitons à présent utiliser ce modèle innovant pour comprendre pourquoi l'autophagie semble indispensable aux LCs, et de déterminer son importance lorsqu'elles sont exposées à des rayonnements UV ou gamma.

Le nombre total de souris nécessaire à notre projet de recherche est de 200 animaux. Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences en culture cellulaire car actuellement il n'existe pas de méthodologie permettant d'obtenir des cellules suffisamment proches des LCs. Nous avons utilisé les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Les prélèvements seront effectués sur souris sacrifiées et les injections sur souris en anesthésie générale par des personnels compétents. Nous nous efforçons de réduire, le cas échéant, une éventuelle souffrance des animaux. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement.

13869 L'épilepsie-absence est une épilepsie généralisée non-convulsive affectant principalement les enfants et les adolescents. Cette épilepsie, d'origine génétique, se traduit lors des crises par une perte soudaine de conscience associée à un arrêt comportemental. Les crises d'absence sont de courte durée (quelques secondes) mais surviennent très fréquemment (10 à 200 /jour) ce qui handicapent lourdement les jeunes patients qui souffrent de déficits de perception et de mémorisation. Ces déficits comportementaux pourraient être dus non seulement aux fréquentes ruptures de contact avec l'environnement lors des crises pluriquotidiennes, mais aussi être aussi à une détérioration des processus d'attention dans la région du cerveau à l'origine des crises. A l'aide de recherches originales et transversales réalisées chez l'homme et chez l'animal, nous chercherons à caractériser les processus épileptogéniques qui sous-tendent, au cours du développement post-natal, la transformation d'une région cérébrale saine les en une région génératrice de crises d'épilepsie. Nous chercherons également à déterminer comment la survenue des crises affecte les processus de perception sensorielle.

Chez l'enfant atteint d'épilepsie-absence (cohorte d'une vingtaine d'enfants), nous analyserons les réponses évoquées par des stimulations visuelles au cours et en dehors des crises. Nous les comparerons à celles obtenues chez des sujets sains conscients de la scène visuelle présentée. Parallèlement, nous explorerons, dans un modèle animal de la maladie présentant de très fortes homologues avec la pathologie humaine (le rat GAERS pour Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg), les mécanismes cellulaires à l'origine de ces altérations de la perception sensorielle. Les réponses sensorielles évoquées dans la région du cerveau initiant les crises d'épilepsie chez les GAERS seront comparées à celles obtenus chez des rats Wistar non-épileptiques.

Nous suivons la règle des '3 R' dans la conduite de nos expériences. Réduction du nombre d'animaux: afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons effectué une planification rigoureuse des expériences en testant au préalable leur faisabilité, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques. Raffinement de la méthodologie: un soin tout particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur ou du stress des animaux grâce à une surveillance constante des paramètres physiologiques (EEG, fréquence cardiaque, température, pCO₂, SpO₂) et un protocole d'intervention spécifique (utilisation appropriée d'anesthésiques généraux ou locaux et myorelaxants) pour chaque indicateur

de souffrance (sensibilité au pincement de la patte, réflexes musculaires, variation de température ou de fréquence cardiaque, modification du patron d'activité EEG). Remplacement des modèles animaux: nous réaliserons sur ordinateur des modèles biophysiques des neurones enregistrés nous permettant de valider certains de nos résultats sans avoir recours à l'utilisation d'animaux vivants. Nous estimons qu'environ 450 animaux seront nécessaires à la réalisation de ce projet d'une durée de 5 ans.

13870 Durant la gestation, un faible nombre de cellules fœtales passe dans la circulation maternelle tout au long de la grossesse chez tous les mammifères ; ces cellules sont bien tolérées et persistent des décennies après la mise bas en se nichant dans la moelle osseuse de la mère. Des études ont montré que ces cellules pouvaient quitter la moelle et migrer vers un tissu maternel lésé (foie, cerveau, cœur, peau et autres) pour participer à sa réparation.

Notre équipe s'est intéressée au rôle de ces cellules fœtales dans la cicatrisation cutanée. Des travaux antérieurs ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation CCR2/CCL2 dans la mobilisation des cellules fœtales au sein des plaies maternelles. L'équipe veut à présent tester l'effet de ces cellules sur d'autres lésions maternelles que la peau tel que le cerveau. Le but de ce projet est donc d'évaluer chez des souris post-gestantes l'effet de CCL2 sur la réparation de lésions cérébrales à travers le recrutement de cellules fœtales.

Les animaux :

* Type : Souris femelles C57BL/6j commerciales et souris mâles C57BL/6j transgéniques permettant une expression ubiquitaire d'une protéine fluorescente (GFP).

* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 200 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

*Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de nouvelles thérapies cellulaires, et indispensable dans la mise en œuvre de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

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

13871 Projet : Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones pléiotropes régulant à la fois le système immunitaire, la réponse au stress et le métabolisme énergétique. Notre groupe s'intéresse au rôle joué par les GC sur les cellules bêta pancréatiques, dont la principale fonction est de sécréter l'insuline, seule hormone hypoglycémisante.

Nous avons pu montrer que suite à un traitement chronique aux GC, la masse de cellules bêta est fortement augmentée, et principalement par la formation de nouveaux îlots, conduisant à une

hypersécrétion d'insuline. Nous pensons que suite au traitement par les GC, les organes cibles des GC comme le foie, le muscle ou le tissu adipeux vont produire un signal qui va agir sur le pancréas pour favoriser la formation de nouveaux îlots et la production d'insuline.

L'objectif du présent projet est de définir les voies de signalisation activées dans les tissus cibles ainsi que dans les précurseurs (cellules canalaire) et les cellules bêta du pancréas.

Les perspectives du présent projet sont de pouvoir à long terme identifier des facteurs circulants permettant d'augmenter la quantité de cellules bêta et la sécrétion d'insuline, et ainsi pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les diabètes.

Les animaux :

* Type : Souris C57BL/6J commerciales.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 288 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

* Remplacement : Notre projet vise à définir les programmes géniques et voies de signalisation activées par les glucocorticoïdes dans les tissus périphériques et les conséquences sur la communication inter-organe avec le pancréas. C'est un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes et les régulations métaboliques entre les cellules qui produisent l'insuline et celles qui y répondent. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire les interactions inter-organes. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu. Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet.

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

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

13872 Ce projet s'intègre dans la formation initiale et le maintien des compétences des nouveaux personnels. L'apprentissage et la maîtrise de certains gestes techniques sont nécessaires pour que la personne soit à même de prendre soin des animaux et de réaliser les actes techniques correctement. Ce projet ne peut être réalisé qu'une fois la connaissance théorique acquise et les méthodes de contention et de manipulation ne peuvent être maîtrisées qu'après avoir été réalisées chez l'animal vivant.

Les personnels, sous supervision d'un tuteur expérimenté, mettent en application les connaissances théoriques qu'ils ont acquises et observées durant leur formation initiale. Ils acquièrent ainsi des savoir-faire pour la contention, l'examen, les prélèvements sanguins et les injections. Cette mise en pratique est réalisée dans la mesure du possible sur des animaux surnuméraires ou issu d'un projet précédent avec avis favorable du vétérinaire, ce qui contribue à la réduction du nombre d'animaux nécessaires. Le tuteur veille au respect des règles de contention des animaux et à la bonne exécution des manipulations réalisées ; le stress et la souffrance sont donc très limités. La surveillance de l'animal par le tuteur durant la manipulation permet le cas échéant d'interrompre celle-ci si elle induit un stress ou une souffrance chez l'animal. Les

manipulations les plus invasives sont réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture antalgique en cas de nécessité.

Il n'y a pas de dommage escompté dans le cas de prélèvement sanguin unique.

Dans le cas de prélèvements sanguins répétés, effectués selon les recommandations du GIRCOR, une attention particulière sera apportée au niveau des sites de prélèvement afin d'éviter tout point de nécrose pouvant entraîner une douleur chez l'animal.

Dans le cas de prélèvements d'urine ou de fèces, les animaux seront hébergés individuellement dans des cages à métabolisme, sur grille. De ce fait, le confort de l'animal est altéré, d'où une attention particulière qui sera portée sur l'état général de l'animal.

Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque mode de prélèvement permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées.

Nombre d'animaux : Sur 5 ans, il est estimé à 2400 rongeurs (600 souris, 600 rats, 600 cobayes, 600 hamsters), 150 lapins et 100 cochons. Le nombre d'animaux sera modulé en fonction du nombre de personnes à former et du nombre de gestes techniques nécessaires.

Les conditions d'hébergement, d'enrichissement et de soins ont été choisies de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne (Directive 2010/63) en vigueur.

La stratégie d'enrichissement est établie afin de permettre à l'animal de reproduire au mieux son environnement naturel et est régulièrement revue/mise à jour.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

13873 Ces dernières décennies, des avancées importantes ont été réalisées sur l'utilisation des plasmas froids dans le domaine biomédical. L'utilisation comme traitement anti-cancéreux de liquides activé par plasma froid (PAL) enrichis en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote suscite un intérêt particulier. Contrairement au traitement cutané par plasma direct, les PALs pourraient être injectés *in vivo* en intra-tumoral. Des recherches préliminaires *in vitro* sur modèle 3D (sphéroïde) de différents types de cancers solides ont montré que les effets cytotoxiques et génotoxiques des PALs se limitent à la périphérie des sphéroïdes. Pour pallier ces problèmes de pénétration, nous proposons d'utiliser l'électroperméabilisation (EP) pour faciliter la pénétration des PALs dans les tumeurs. En effet, l'EP est une méthode physique qui consiste en l'application de champs électriques pulsés externes à l'aide de 2 électrodes. Cette technique peut conduire à la perméabilisation réversible des cellules ou du tissu ciblé. L'EP réversible est utilisée en clinique humaine et vétérinaire pour l'électrochimiothérapie et l'électrogénothérapie afin de faciliter l'entrée de molécules anti-cancéreuses ou de plasmides, respectivement. La combinaison de ces deux approches lors d'expériences *in vitro*, a conduit à une potentialisation de la cytotoxicité des PALs par l'EP conduisant à la mort totale des sphéroïdes de cellules cancéreuses quelques heures seulement après le traitement combiné. De plus, il a été montré que les PALs ou l'EP (réalisés de façon indépendante) engendrent une mort immunogénique, et ainsi l'activation du système immunitaire, ce qui en fait deux bons candidats pour les thérapies anti-cancéreuses.

La transposition de cette méthodologie *in vivo*, pouvant conduire à la diminution voire à l'élimination des tumeurs solides, reste à explorer. Ces tests précliniques permettront l'évaluation du potentiel des PALs seuls ou en combinaison avec l'EP comme nouvelle stratégie thérapeutique anti-cancéreuse.

Ce projet, avec ces différentes étapes, nécessite l'utilisation de 2880 souris.

Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R :

Remplacement: Des recherches sur modèle de tumeurs *in vitro* ont déjà été effectuées et ont fait l'objet d'une publication scientifique. Des études précliniques sur l'animal nous permettront d'obtenir un niveau de compréhension plus avancée.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Quand cela est possible, les différentes parties du projet sont regroupées pour réduire le nombre de groupes observés. L'utilisation de la bioluminescence couplée à l'imagerie non invasive va permettre de suivre dans le temps un même animal. Ceci réduit considérablement le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

Raffinement: Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement. Toutes procédures effectuées sur les animaux seront entreprises de façon à réduire, supprimer et soulager tout inconfort, douleur, détresse ou angoisse subie par les animaux (anesthésie, analgésie, point limites ...). Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible tout stress des animaux.

13874 Notre souhaitons comprendre les mécanismes cellulaires perturbés par la prise d'alcool sous forme de binge (fortes doses répétées) et responsables des défaillances de mémoire chez les adolescents pratiquant donc le binge drinking. S'il est connu que l'alcool à hautes doses perturbe la mémoire chez l'adulte, peu de choses sont connues chez les jeunes et notamment les mécanismes cellulaires responsables des défaillances mnésiques (black-out) à court et à long terme. De plus, la sensibilité des femelles par rapport aux mâles est très mal documentée alors que les filles rattrapent les garçons en ce qui concerne la consommation d'alcool. La mémoire chez l'Homme comme chez les animaux supérieurs est localisée dans la structure cérébrale appelée hippocampe et nécessite des interactions entre neurones dans cette structure. Il est donc nécessaire d'enregistrer les neurones de l'hippocampe dans un modèle expérimental conservant l'intégrité anatomique et fonctionnelle de la structure. Le remplacement par l'approche « *in vitro* » sur tranche isolée d'hippocampe de rat que nous utiliserons est la mieux adaptée pour étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents aux effets de l'alcool et pour réduire le nombre d'animaux utilisés (jusque 8 tranches par animaux et donc 8 résultats, peuvent être obtenues en lieu et place d'un animal vivant testé). Cette étude portera sur 3850 rats, incluant des traités et des contrôles, sur une durée de 5 ans. Nous testerons 1) des femelles pré-pubères, 2) des femelles post-pubères en phase de pro-oestrus (2a) et en phase d'oestrus (2b), 3) des mâles pré-pubères et 4) des mâles post-pubères à raison de 10-15 animaux par groupe pour observer des différences significatives entre groupes. Ainsi le rôle de la puberté sera examiné dans les deux sexes de même que le rôle du cycle de reproduction chez la femelle. Trois approches expérimentales seront mises en œuvre afin de découvrir le mode de fonctionnement de l'alcool: i) l'enregistrement des neurones de l'hippocampe sur tranche *in vitro*; ii) l'analyse des capacités d'apprentissages des animaux après traitement à l'alcool; iii) l'analyse d'un grand nombre de paramètres histologiques et fonctionnels seront évalués sur les mêmes animaux. Dans un premier temps, les animaux recevront 2 injections (« double binge ») d'alcool en un jour à 9h d'intervalle afin de mimer une répétition courte d'ivresses et les trois approches expérimentales seront effectuées à +24h, +48h et +8jours. Dans un second temps, le "double binge" sera répétée tous les trois jours sur 3 semaines pour mimer une exposition longue au binge drinking telle que dans la population humaine. Les mêmes mesures que précédemment, aux mêmes temps, seront effectuées pour les mêmes groupes. Nous éviterons d'éventuelles douleurs en alternant les sites d'injections, par exemple. Enfin, les mêmes groupes seront analysés après exposition à des agents pharmacologiques des cibles déterminées de l'alcool afin de prévenir/contrer ses effets. Le raffinement pour diminuer les angoisses sera assuré par un hébergement enrichi (stimulations sensorielles), en groupe (activités sociales) et en présence de musique dans la pièce de stabulation. Toutes les mesures seront mises en œuvre afin de limiter souffrance et douleurs éventuelles. Le respect de points limites est prévu. L'ensemble de ce projet permettra de mieux comprendre le mode d'action de l'alcool dans le cerveau des jeunes tout en

indiquant d'éventuelles cibles pharmacologiques permettant d'atténuer les effets négatifs du binge drinking.

13875 L'intervalle intergénérationnel important dans l'espèce bovine constitue un facteur limitant de la diffusion du progrès génétique, levier majeur de la compétitivité des élevages. L'utilisation d'animaux jeunes pour la production d'embryons est un facteur clé pour la réduction de l'intervalle entre générations. L'apparition de la puberté étant fortement liée au développement corporel des animaux, des études antérieures ont montré qu'il était possible d'avancer significativement l'âge à la première ovulation des génisses en jouant sur leur nutrition pendant des étapes clés de leur croissance pré-pubertaire. Toutefois, les limites biologiques de ces phases de puberté et de reproduction précoces sont encore inconnues, de même que la capacité de ces génisses précoces à produire des embryons et également les conséquences de cette pratique sur la carrière ultérieure de l'animal et de sa descendance. Le présent projet a pour objectif d'apporter des éléments de réponse concrets à cette problématique.

Le présent projet est prévu pour deux lots de 25 génisses laitières de race Holstein suivies sur deux générations, il concerne donc 100 animaux au maximum.

Dans le cadre de ce projet sur la croissance de veaux Holstein, nous établirons l'impact de régimes nutritionnels différenciés sur l'activité ovarienne et la qualité des ovocytes pendant cette période. Pour ce faire, après un sevrage à 9 semaines et la mise en place des conduites différenciés, des ovocytes seront collectés sur des animaux à l'âge de trois et six mois. Les ovocytes seront comparés sur des paramètres morphologiques, en particulier le diamètre, le contenu en organites et gouttelettes lipidiques et leur distribution spatiale dans l'ovocyte, et des paramètres moléculaires.

Cette expérimentation est incluse dans un programme plus large qui permettra l'évaluation des performances obtenues par les deux plans d'alimentation en mesurant divers paramètres sur les animaux, liés à la croissance et au développement des tissus musculaires, adipeux, des pré-estomacs, des glandes mammaires, à la reproduction, et à d'autres performances zootechniques suivies sur l'ensemble de la carrière des animaux (production laitière, santé).

Les descendants des animaux suivis en première génération seront soumis au même protocole dans le but de mettre en évidence d'éventuels effets trans-générationnels.

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

Remplacement : aucun modèle *ex vivo* ou *in silico* n'étant aujourd'hui disponible concernant les relations entre les paramètres d'autant de fonctions biologiques (nutrition, croissance, métabolisme, puberté, reproduction, santé, comportement), le recours à l'animal est nécessaire.

Réduction : le présent protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en garantissant une approche statistiquement valable et en conservant un minimum de variabilité individuelle.

Raffinement : les génisses laitières utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne et hébergées dans une nurserie toute neuve de 350m² construite spécifiquement pour ce projet et répondant aux normes en vigueur sur le plan du bien-être animal (aires paillées, automates d'alimentation en lait, en eau et en concentré céréaliers avec suivi des consommations journalières individuelles, colliers d'activité, brosses latérales et dorsales). Toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie locale (prises de sang, biopsies de tissu adipeux) ou locorégionale (endoscopies, ponctions ovariennes) après tranquilisation des animaux. Pour les endoscopies, les animaux bénéficieront d'une anesthésie épidurale et d'une anesthésie paravertébrale proximale. Pour les ponctions ovariennes par voie naturelle, les animaux bénéficieront d'une anesthésie épidurale.

13876 Le système endocannabinoïde (SEC) est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques dont la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire. Ce système est essentiellement constitué par des endocannabinoïdes qui sont des molécules ressemblant au principe actif du cannabis, le delta-9 THC, qui agissent sur les mêmes récepteurs (CB1R et CB2R). Aujourd'hui, il est clairement établi que la fixation des endocannabinoïdes sur les CB1R localisés dans le cerveau

conduit à une stimulation de la prise alimentaire et à une prise de poids. C'est pourquoi des stratégies pharmacologiques visant à bloquer les CB1R ont été développées pour traiter l'obésité et les pathologies associées. Le Rimonabant (Acomplia, SR141716) fut le premier composé capable de bloquer les CB1R à être commercialisé et prescrit comme agent anti-obésité. Son efficacité en termes de perte de poids a été mise en évidence dans une série d'études majeures. Ce médicament a en plus exercé des effets favorables sur le glucose sanguin, les graisses circulantes ou encore l'accumulation de graisse dans le foie, des paramètres généralement augmentés au cours de l'obésité et qui peuvent conduire à des maladies graves (diabète, troubles hépatiques, maladies cardio-vasculaires). Cependant, ce médicament en agissant sur le cerveau s'accompagnait également d'effets psychotropes (dépression). C'est pourquoi sa commercialisation a été suspendue. Toutefois, en plus du cerveau, les CB1R sont également présents en périphérie dans de nombreux organes dont le pancréas, le foie, les muscles et le tissu adipeux. Plusieurs études dont certaines réalisées au laboratoire, ont montré que le blocage des CB1R périphériques contribue également à l'amélioration de la santé induite par le Rimonabant.

C'est pourquoi notre projet vise à tester sur des modèles des souris obèses, les effets de nouveaux agents thérapeutiques « anti-obésité » capables de bloquer spécifiquement les CB1R périphériques sans agir sur les CB1R du cerveau. Cette étude devrait en plus permettre de mieux comprendre le fonctionnement du SEC périphérique et comment son hyperactivation peut conduire à une dérégulation du métabolisme énergétique (Procédure 1).

Les molécules capables de bloquer les CB1R périphériques sont développées en collaboration avec des chimistes et leurs effets seront comparés à ceux exercés par des molécules déjà caractérisées issues du commerce.

L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet d'étude pré-clinique qui permettra d'analyser les mécanismes fondamentaux impliqués dans le développement de l'obésité. En effet, il n'est pas possible d'étudier la régulation du métabolisme énergétique en se limitant à des approches *in vitro*. Toutefois, pour étudier les effets directs des nouvelles molécules sur le métabolisme du tissu adipeux qui joue un rôle clé dans l'apparition des maladies liés à l'obésité, nous utiliserons des petits prélèvements tissulaires (explants) prélevés chez le rat et mis en culture (Procédure 2). Par ailleurs, dans un souci de réduire le nombre d'animaux, nous mènerons certaines expériences sur des cellules de tissu adipeux en culture disponibles dans le commerce.

Dans la procédure 1, nous utiliserons des souris mâles adultes (540 au total sur 5 ans) soumises soit à un régime alimentaire standard, soit enrichi en graisses afin d'induire une obésité. Notre étude portera sur plusieurs modèles murins dont certains génétiquement modifiés dans lesquels CB1R est soit totalement absent soit seulement éliminé dans une population de cellules immunitaires.

Ces animaux seront traités par les molécules tests sur des périodes allant de 2 à 4 semaines. Les traitements ne devraient pas entraîner d'effets dommageables chez les souris car la plupart des molécules testées auront (en tant que telle ou sous une forme légèrement modifiée) déjà passé des tests toxicologiques. Ces molécules seront administrées par voie orale afin de limiter les risques d'infections inhérentes à de multiples injections. Les lignées génétiquement modifiées ne devraient pas développer de phénotype dommageable. Cependant, nous opérerons un suivi des élevages afin de détecter tout dommage imprévu et ainsi intervenir pour soulager/abréger toute souffrance.

Nous utiliserons des souris mâles, car il est connu que les souris femelles sont moins susceptibles de développer une obésité suite à un régime gras. Cependant, dans un souci de réduction et en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », les souris femelles issues des croisements des différents élevages pourront être utilisées pour étudier les cellules primaires du foie *in vitro*, ainsi que pour la mise au point de certaines techniques.

La procédure 2 de ce projet consiste à déterminer si les molécules d'intérêt, en inactivant les CB1R, peuvent exercer des effets directs sur le métabolisme du tissu adipeux en précisant les mécanismes. Pour cela, les expérimentations seront menées *in vitro* sur des explants de tissus. Par application des principes de remplacement et de réduction, le modèle rat a été choisi, car il présente une masse grasse plus importante que la souris et nous pourrions ainsi aisément disposer d'une

cinquantaine d'échantillons homogènes avec un seul animal. Le nombre de rats nécessaires pour cette procédure est réduit à 60 sur 5 ans.

Les souris et rats utilisés dans ce projet seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs ou le personnel qualifié des animaleries. Tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette et des bâtons à ronger. Enfin, par respect du principe de raffinement, le nombre d'animaux sera réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Nous limiterons au maximum l'utilisation d'animaux pour les études mécanistiques en complétant ces approches par l'utilisation de différentes lignées cellulaires.

Enfin, lors des périodes de traitement et le jour de chaque expérimentation, les animaux seront manipulés par des personnes expérimentées titulaires du niveau B. Bien que notre intérêt principal concerne les tissus impliqués dans le métabolisme énergétique, nous nous efforcerons de collecter d'autres organes afin de mettre en place une banque d'organes nous permettant de mutualiser les échantillons et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaires pour de futurs projets ou des projets collaboratifs.

13877 CONTEXTE

L'adénocarcinome pancréatique fait partie des cancers les plus agressifs. Quel que soit le traitement, le taux de survie global de 5 ans est inférieur à 5%. Cette maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé et, par conséquent, seulement 15% à 20% des patients sont candidats à une résection chirurgicale. Environ 30% à 40% des patients ont une maladie métastatique au moment du diagnostic et dans ces cas, la survie est d'environ 9 mois. Les 30% à 40% restants des patients ont un cancer pancréatique localement avancé au moment du diagnostic, leur survie globale médiane est d'environ 1 an. Bien que de nouveaux protocoles de chimiothérapie entraînent une survie améliorée, le pronostic pour le cancer pancréatique localement avancé reste sombre et sans perspective de survie à long terme.

Il a été démontré dans un premier temps qu'il était possible de détruire du tissu pancréatique par un traitement par ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU). L'inconvénient de la technique est qu'il a été observé des occlusions des vaisseaux très proches des zones à traiter. Dans un second temps, les paramètres du traitement ont été modifiés pour permettre la visualisation des vaisseaux ciblés et le flux par effet Doppler. Toutefois la résolution temporelle des images Doppler est insuffisante pour estimer avec précision des modifications vasculaires survenant lors du traitement HIFU. Sur la base de ces observations une nouvelle approche a été mise au point permettant de conserver la visualisation bidimensionnelle et en ajoutant le monitoring à haute fréquence en un point à l'intérieur du vaisseau ciblé. Nous souhaitons à présent renouveler les expériences réalisées avec ce nouveau moyen de contrôle afin d'évaluer sa pertinence.

OBJECTIFS

Premier objectif : en utilisant les données récoltées sur les précédentes procédures expérimentales concernant les paramètres du traitement HIFU dans un contexte chirurgical, évaluer la pertinence de la mesure de flux en un point du vaisseau ciblé par effet Doppler, en plus de l'information 2D déjà présente pour mettre en évidence des altérations vasculaires survenant durant le traitement HIFU.

Deuxième objectif : Si le premier objectif est totalement atteint, une seconde procédure consistera à observer le comportement des vaisseaux traités à moyen terme.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 2 ans mettra en œuvre un maximum de 12 porcs dont 10 réutilisés d'un autre projet. Le modèle expérimental est représenté par les artères spléniques et mésentérique de l'animal qui présentent l'intérêt d'avoir une taille (5 mm de diamètre) sensiblement identique à l'artère mésentérique humaine qui sera incluse dans les protocoles de traitement clinique des tumeurs pancréatiques. Après de nombreux essais *in vitro* et *ex vivo*, il est indispensable à ce stade de travailler sur l'animal entier pour évaluer la précision du traitement, les effets sur les tissus à proximité et les vaisseaux en présence du flux sanguin.

Au cours de la première procédure, 10 animaux maximum subiront une laparotomie sous anesthésie générale et seront euthanasiés sans réveil après l'application du traitement (tirs HIFU sur le pancréas et la rate et des mesures par doppler (ces derniers n'induisant aucune douleur). Si la technique d'évaluation d'innocuité du traitement s'avère satisfaisante et que les vaisseaux sont préservés par le traitement, 2 animaux seront refermés, réveillés et maintenus sous observation sous antalgique pendant 15 jours (pour mimer le temps d'observation chez l'humain prenant en compte le temps de cicatrisation des vaisseaux) et seront ensuite mis à mort et autopsiés.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction : Le maximum de test sera effectué afin de tirer le maximum d'informations tout en respectant le bien-être de l'animal (réutilisation de 10 animaux sous contrôle vétérinaire). Seul le nombre d'animaux suffisant sera utilisé (au maximum 10 + 2).

Raffinement : Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La chirurgie est effectuée par un chirurgien expérimenté. Un protocole antidouleur post chirurgie sera mis en place avec un suivi très serré et des points limites éprouvés sont décrits.

Remplacement : Les mises au point des techniques HIFU et doppler ont été au préalable effectuées sur tissus de boucherie.

13878 Les chèvres laitières sont sensibles aux infections mammaires (inflammation de la mamelle), et mesurer de façon automatisée (sans contention) leur température améliorerait de façon importante le suivi de ces infections. En effet, la santé des animaux d'élevage fait partie intégrante de leur bien-être. Le plan national 'Ecoantibio', qui vise à la diminution d'utilisation des antibiotiques, incite par son Axe I, au développement des mesures de prévention. La détection précoce d'une infection est capitale pour la guérison de l'animal et/ou la maîtrise de la contagion vers ses congénères. C'est dans ce contexte que nous voulons tester un dispositif qui aiderait à la détection précoce d'une infection. Ce projet a donc pour objectif de placer un dispositif électronique sous cutané de la taille d'un grain de riz (longueur 15 mm, diamètre 1 mm). Ce dispositif est basé sur la technologie RFID (radio frequency identification) qui est aussi utilisée pour l'identification des animaux de compagnie (chiens, chats, chevaux). Aujourd'hui, la dernière génération de ces implants offre, en plus de l'identification, la possibilité de recueillir la température corporelle via un simple lecteur RFID, largement utilisé en élevage avec les boucles d'identification placées sur l'oreille. La température indiquée par l'implant est recueillie via une antenne de lecture reliée à un micro-ordinateur et enregistrée sous forme d'un fichier chronodaté avec le numéro de l'implant.

Ce dispositif sera implanté sur 8 chèvres adultes hors lactation de race alpine dont 3 chèvres qui serviront de témoin. Un challenge inflammatoire à base de Lipopolysaccharide (LPS), induisant une inflammation, sera réalisé par voie générale sur 5 chèvres, afin d'évaluer la sensibilité du dispositif (procédure modérée). Les 3 chèvres témoins seront inoculées avec un soluté physiologique. Ce challenge provoque une augmentation de la température corporelle modérée (maximum attendu +2C°) sur une courte durée (10H maxi). Une comparaison avec la méthode de référence basée sur la température transrectale jugera la pertinence de ces implants sous cutané (procédure légère). De plus le dispositif sera valorisé pour tester le profilage de la réponse immunitaire chez le caprin à l'aide d'un test *in vitro* développé chez le bovin. Pour cela, nous prélèverons du sang (procédure classe légère) avant et après le challenge LPS (11 prélèvements sur la durée du protocole).

Remplacement : la modification de la température corporelle implique des modifications biologiques complexes, qui ne peuvent être étudiés qu'*in vivo*.

Réduction : le nombre de chèvres a été défini afin de pouvoir évaluer la technique tout en tenant compte de la diversité de réponse biologique à un challenge inflammatoire.

Raffinement : les chèvres seront hébergées en groupe, sur litière paillée. Les chèvres feront l'objet d'une surveillance accrue pendant toute la durée du protocole. En cas de symptôme inquiétant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire. La mise en place des implants sera réalisée par des opérateurs expérimentés et habilités (animaliers), qui côtoient ces animaux quotidiennement. L'application d'un baume décongestionnant, antiseptique et cicatrisant sera réalisée après la pose de l'implant.

13879 Contexte et objectifs:

L'insuffisance hépatique aiguë (hépatite fulminante) est une altération aiguë de la fonction hépatocytaire dont l'origine peut être médicamenteuse (l'intoxication au paracétamol représente 50% des cas d'hépatite fulminante dans les pays développés), virale (hépatites virales A ou B) ou auto-immune (dans moins de 5% des cas). Les conséquences peuvent être dramatiques allant d'une hypoglycémie et une acidose lactique, jusqu'à des troubles de la coagulation (accompagné d'un risque hémorragique élevé), une mort cellulaire importante, nécessitant dans la majeure partie des cas une transplantation de foie.

Plusieurs modèles murins d'insuffisance hépatique aiguë (IHA) ont été décrits dans la littérature. Un premier modèle est l'intoxication au paracétamol. Un deuxième modèle est l'administration simultanée d'une dose faible de LPS et de D-Galactosamine. Ils sont cliniquement pertinents, et permettent de reproduire les divers aspects de la pathologie humaine suite à une intoxication médicamenteuse. Dans les deux cas, et comme chez l'Homme, ces composés vont causer in fine une fragmentation de l'ADN. Ces fragments vont agir comme des signaux de danger et activer la voie de l'inflammasome NLRP3 entre autres.

Nous travaillons à mieux comprendre les fonctions physiologiques du récepteur nucléaire Rev-erba, et déterminer s'il peut être utilisé pour la validation de nouveaux traitements contre les pathologies inflammatoires. Nos résultats obtenus *in vitro* (avec des cellules) ou à partir d'expériences exploratoires menées chez la souris démontrent que Rev-erba réprime des gènes pro-inflammatoires. En conséquence, l'invalidation de Rev-erba au sein des macrophages, ou dans le foie, augmente une voie inflammatoire de réponse au stress, l'inflammasome. De plus, l'expression de Rev-erba varie au cours du cycle jour/nuit ainsi que la réponse inflammatoire qui est corrélée à l'expression de Rev-erba (réponse inflammatoire élevée lorsque l'expression de Rev-erba est faible, et vice versa). Au contraire, l'ajout d'une molécule synthétique activatrice (ligand) de Rev-erba permet de diminuer l'inflammasome *in vitro*. Ceci nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'utilisation de ces ligands pourrait se révéler prometteuse dans le traitement des pathologies inflammatoires. Dans ce projet, nous souhaitons tester leur potentiel effet bénéfique dans le traitement de l'IHA dans les deux modèles décrits précédemment.

Justification de l'expérimentation décrite et méthodes mises en œuvre pour réduire le nombre d'animaux:

Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans l'IHA : d'un côté les hépatocytes qui, en entrant en apoptose ou nécrose vont libérer des signaux d'activation, de l'autre côté plusieurs cellules du système immunitaire qui vont percevoir ces signaux et en réponse vont sécréter des signaux pro-inflammatoires et moduler la réponse inflammatoire. Une meilleure compréhension du rôle de Rev-erba et de son potentiel en tant que nouvelle cible thérapeutique nécessite d'évaluer son implication sur ces différents processus dans plusieurs types cellulaires et à différents moments du cycle jour/nuit à l'échelle de l'organisme entier *in vivo*, même si l'étude des mécanismes moléculaires responsables sera menée *in vitro* sur des cellules (hépatocytes et du système immunitaire). De plus, nous devons déterminer si les activateurs de Rev-erba ont une action bénéfique significative *in vivo* (nous avons déjà réalisé la preuve de concept *in vitro*). Nous avons mis en place un modèle mathématique pour modéliser les variations circadiennes afin de diminuer le nombre de souris étudiées en faisant des prédictions sur l'heure d'administration optimale d'un activateur de Rev-erb. Enfin, des procédures standardisées nous permettront non seulement de diminuer la variabilité mais aussi de comparer les résultats des expériences menées, diminuant ainsi le nombre d'animaux étudiés. Le nombre total d'animaux sera de 640 souris.

Méthodes mises en œuvre pour atténuer la souffrance ou le stress induit par les manipulations, et améliorer le bien-être des animaux:

Afin d'atteindre l'objectif, nous évaluerons la conséquence d'une invalidation de Rev-erba introduite au niveau du corps entier ou dans des cellules ou organes spécifiques (souris génétiquement modifiées). Ces invalidations n'engendrent, par elles-mêmes, aucune souffrance. Ces souris seront soumises à un stress inflammatoire modéré aigu et traitées ou non avec une molécule à visée thérapeutique.

Il est important, s'agissant d'évaluer l'inflammation chez nos souris, que les animaux soient maintenus dans des conditions d'hébergement dépourvues de stress, et que nos animaux soient maintenus dans un statut sanitaire excellent. Le stress inflammatoire sera soit l'administration de paracétamol, un antalgique antipyrétique indiqué chez l'Homme dans le traitement des douleurs d'intensité faible à modérée et de la fièvre, soit de LPS à très faible dose et de galactosamine. Dans les deux cas, la procédure d'euthanasie sera mise en oeuvre sous anesthésie si des signes de souffrance ne pouvant être soulagée étaient visibles. Enfin, le bien-être de l'animal depuis sa naissance jusqu'à sa mort sera pris en compte grâce à un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, la présence d'abris et de jeux dans les cages, une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, et la prise en compte de tout signe physique de stress ainsi que de la hiérarchie sociale.

13880 Ce projet se propose de développer un nouveau dispositif médical implantable permettant la délivrance de molécules de façon contrôlée et avec une meilleure précision dans le cadre de traitements anticancéreux post-chirurgicaux du glioblastome. Le ou les site(s) d'infusion visé(s) sont particulièrement tissu cicatriciel autour de la zone d'excérèse, l'objectif étant une délivrance continue des produits chimio-thérapeutiques dans la zone où les récurrences tumorales sont les plus fréquentes en raison de la dissémination tumorale, de la barrière hémato-encéphalique et de la faible perméabilité du tissu cicatriciel (ainsi que de sa richesse en cellules gliales). Dans le cas présent, notre objectif n'est pas de traiter un processus tumoral intra-crânien qui modéliserait le glioblastome mais d'évaluer la capacité de notre dispositif à réaliser une perfusion permanente dans une zone d'excérèse de tissu cérébral pendant une durée correspondant aux traitements de chimiothérapie anticancéreuse habituels et de vérifier l'absence d'effet indésirable inattendu.

Le glioblastome multiforme (GBM) représente 70% des tumeurs malignes primitives du cerveau. Ce type de cancer reste rare et touche environ 3 personnes sur 100000. Le traitement consiste presque toujours en une excérèse tumorale étendue suivie de traitements radio- ou chimio-thérapeutiques. Malheureusement, une récurrence locale est presque systématique.

Avant tout essai clinique chez l'Homme, même si les chances de guérison sont presque nulles pour les patients atteints de ce type tumoral, une phase d'essais chez l'animal est indispensable pour évaluer l'efficacité et la biocompatibilité du dispositif. Cette phase pré-clinique permet également d'améliorer le dispositif tant en termes de performance que d'ergonomie d'implantation. Des essais préalables chez le rat ont permis de vérifier la viabilité du concept, mais avant tout essai chez l'homme, un essai de dispositif de dimensions très proches de celles qui seront nécessaires dans notre espèce sur un tissu cérébral de volume suffisant et d'anatomie proche - donc sur une espèce de plus grande taille que les rongeurs - demeure indispensable afin de ne pas mettre en danger les patients.

Le présent projet consiste à simuler l'excérèse d'une tumeur cérébrale et à implanter le dispositif de manière à ce qu'il délivre un liquide physiologique stérile dans la future zone cicatricielle. Le volume délivré sera vérifié à différents points temporels pendant la phase de chimiothérapie habituelle. Cette vérification consistera en un examen d'imagerie tomographique avec administration d'un produit de contraste.

Pour que le projet ait produit suffisamment de résultats probants pour qu'un essai clinique de dispositifs médicaux soit autorisé sur des patients humains, le nombre de dispositifs comparés aux produits sur le marché est habituellement de 20. Nous prévoyons une phase de mise au point portant sur 5 animaux. En conséquence, le projet inclura un maximum de 25 brebis adultes.

Comme indiqué précédemment, l'utilisation d'animaux pour la mise au point et la preuve d'efficacité et d'innocuité est non seulement indispensable avant les premiers essais chez l'homme mais elle est de surcroît obligatoire. Le nombre d'animaux indiqué est un maximum, tel que défini par les textes normatifs en vigueur. Toutefois une réduction de ce nombre peut parfois être accordée par les comités de protection des patients atteints de maladies au pronostic sombre, comme les GBM. Cette réduction du nombre sera appliquée dès que l'avis aura été rendu. Au cours de la phase chirurgicale, les animaux bénéficieront d'une anesthésie adaptée. L'excérèse d'une partie du cortex sera suffisamment réduite pour ne pas impacter leurs conditions de vie. Accessoirement, le cerveau

est réputé comme un organe insensible à la douleur et l'impact sur l'animal devrait être modéré si la zone d'exérèse est réduite et choisie avec soin, d'où la nécessité de mettre en place une phase de mise au point car la neurochirurgie des ovins est un domaine peu connu.

13881 Le cancer est un problème de santé publique majeur qui affecte tous les pays. Les thérapies utilisées, dont les chimiothérapies, ont allongé l'espérance de vie des patients et même permis des rémissions complètes. Cependant, ces chimiothérapies (principalement les anthracyclines qui sont des intercalant d'ADN inhibant la vie cellulaire) ont des effets secondaires dont le développement d'une insuffisance cardiaque pouvant gréver le pronostic de ces patients. On distingue la cardio-toxicité précoce, qui se développe quelques semaines ou mois après la fin du traitement et la cardio-toxicité tardive liée aux anthracyclines qui peut se manifester des années jusqu'à des décennies après la fin du traitement.

Les mécanismes de déclenchement de cette toxicité tardive conduisant à une dysfonction cardiaque restent inconnus. Nous avons émis l'hypothèse que la survenue d'un deuxième « stress » cardiaque démasquerait cette cardio-toxicité tardive. Nous allons développer un modèle murin recevant dans un premier temps des anthracyclines à un stade juvénile. Dans un 2ème temps nous induirons différents stress cardiaques (voir « a », « b », « c » et « d »), à l'état adulte. Notre objectif est d'établir un modèle murin mimant une cardio-toxicité tardive après une exposition juvénile aux anthracyclines qui permettra dans un 1er temps la recherche de biomarqueurs diagnostics et pronostiques dans un objectif final d'établir des traitements préventifs. Le choix d'un modèle juvénile permettra de répondre à un besoin urgent de prévention contre la cardio-toxicité tardive survenant chez un nombre croissant de patients ayants survécus à un cancer durant leur enfance.

Pour cela 4 modèles seront développés :

a. Cardio-toxicité tardive liée à la grossesse et au postpartum

Aujourd'hui, un nombre croissant de femmes qui ont survécu à un cancer durant leur enfance, ont un souhait de grossesse. La grossesse et l'accouchement induisent un stress cardiaque qui peut déclencher des maladies cardiaques en peripartum ou post-partum. Nous émettons l'hypothèse selon laquelle la grossesse pourrait démasquer et aggraver une cardio-toxicité infra-clinique liée aux anthracyclines reçues dans l'enfance ou l'adolescence. Le modèle repose sur un traitement anthracyclines débutant à l'âge de 5 jours. Les femelles seront mises en accouplement à l'âge de 12 semaines et seront suivies au plan cardiaque (de façon similaire à ce qui se pratique en clinique par échocardiographie) jusqu'à la fin du protocole.

b. Cardio-toxicité tardive liée à un entraînement physique

L'entraînement physique intense a été associé à la survenue de dysfonctions cardiaques. Le lien avec une cardio-toxicité tardive liée aux anthracyclines reste inconnu. L'exercice physique induit une adaptation physiologique du cœur à la surcharge de volume essentiellement via une hypertrophie physiologique et réversible. Les souris (vont être soumises à un protocole d'exercice sur tapis roulant pendant 8 semaines, la vitesse et le temps augmentent de façon incrémentée. La vitesse maximale est fixée à 35 cm/s pendant 40 min. Ce modèle va apporter des réponses sur le rôle de l'hypertrophie physiologique dans la cardio-toxicité tardive liée aux anthracyclines.

c. Cardio-toxicité tardive liée à l'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) représente un facteur de risque important dans la survenue de la cardio-toxicité chez le patient ayant reçu des anthracyclines. Nous émettons l'hypothèse selon laquelle la survenue d'une hypertension artérielle peut déclencher une toxicité cardiaque. L'hypertension sera induite par l'angiotensine II (mini-pompes). L'HTA par angiotensine II est un modèle classique, dans ce protocole les souris recevront la doxorubicine à l'âge pré-pubère (5 à 20 jours, Protocole C1) ou à l'âge jeune adulte (9-10 semaines, Protocole C2), puis 8 (Protocole C1) ou 5 semaines (Protocole C2) plus tard elles seront soumises à une HTA pendant 2 mois.

d. Cardio-toxicité tardive liée au diabète de type I

Comme pour l'hypertension artérielle, la survenue du diabète chez le jeune adulte est assez commune. L'implication du diabète dans le déclenchement de la cardio-toxicité liée aux

anthracyclines n'est pas connue. Le diabète sera induit par injection journalière de streptozotocine et ceci pendant 5 jours. Les souris recevront donc la doxorubicine de l'âge de 5 jours à 20 jours. L'injection de la streptozotocine débutera à l'âge de 12 semaines.

Le projet implique 520 souris (male, femelle, et femelle pendant la grossesse, 10 souris par groupe) qui recevront le protocole de chimiothérapies selon le schéma actuel, i. e. doxorubicine (1 fois tous les 5 jours pendant 20 jours, 4 injections au total, dose totale de 3 mg/kg). La réduction du nombre de souris est obtenue par un suivi longitudinal par échocardiographie, et par la conception de groupes contrôles communs aux différents protocoles de chimiothérapie.

Chacune des procédures a été raffinée. Nous utiliserons une acclimatation progressive pour la mesure de pression, la prévention de douleur lors et après la pose de mini-pompes, l'utilisation d'un antalgique local pour la mesure de la glycémie ainsi que l'utilisation d'anesthésiant pour l'échocardiographie. Toutes ces méthodes, en association avec une stabulation de 3 souris par cage et une surveillance étroite, seront utilisées afin d'assurer le confort de la souris et empêcher au maximum une douleur ou un stress inutiles.

Ce projet pourrait permettre d'identifier une population particulièrement à risque de développer une cardio-toxicité post-chimiothérapie et donc d'établir un traitement préventif cardio-protecteur.

Le développement de modèles précliniques chez la souris est indispensable et ne peut être remplacé par des modèles *in vitro* incapables de mimer la complexité des processus mis en jeu.

13882 Le virus de la rougeole (VR) est en forte réémergence en Europe ces dernières années avec plus de 20 000 cas recensés en France depuis 2008, causant en moyenne près de 140 000 décès chaque année dans le monde. Ce virus est connu pour être l'un des virus humains les plus contagieux. L'inoculation du virus s'effectue par voie respiratoire, après inhalation de gouttelettes provenant des voies aériennes d'un sujet infecté (générées par la toux, éternuements ou la parole) ou après contact avec des objets souillés par des sécrétions respiratoires infectées.

L'incubation dure en moyenne 10 jours du moment de l'exposition au début des premiers signes cliniques. Les premiers symptômes sont généralement la fièvre, la toux, la conjonctivite et la rhinite, et ensuite une éruption cutanée apparaît quatre jours après. D'autres complications peuvent apparaître pour les personnes plus à risque (nourrissons, immunodéprimé) telles que la pneumonie, l'encéphalite. Les personnes de tout âge peuvent être infectées par le VR mais les personnes les plus à risque restent les enfants de moins de 5 ans.

En France, la vaccination contre la rougeole a commencé dans les années 1980, ce vaccin était fortement recommandé. A partir de janvier 2018, ce vaccin est devenu obligatoire à l'âge de 12 mois. L'infection par le VR reste une cause majeure de mortalité chez les jeunes enfants à travers le monde en dépit de l'existence d'un vaccin efficace.

Les épidémies dans les pays développés sont souvent associées à un défaut de vaccination, néanmoins un nombre croissant de cas apparaît au sein des populations vaccinées. Si le vaccin actuel est efficace, la réponse immunitaire qu'il engendre varie significativement d'un individu à l'autre. En effet, jusqu'à 10% des gens ne développent pas une réponse anticorps protectrice adéquate même après avoir reçu les 2 doses recommandées, contrairement à l'immunité à très long terme élicite par l'infection naturelle. De plus, il n'existe ni moyen de prévention ni traitement contre l'infection par le VR chez les personnes immunodéprimées.

Le but principal de ce projet est de développer nouvelle stratégie antivirale reposant sur la conception et réalisation d'un système d'administration par nébulisation dans les voies respiratoires de peptides inhibiteurs de l'infection par le VR chez les primates non humains, système qui soit simple, rapide et efficace.

Cette approche présente une stratégie nouvelle visant à protéger la population à risque contre l'infection par les virus respiratoires, incluant le VR chez les individus non protégés par le vaccin. Il s'agit d'une approche de protection antivirale non-invasive, « sans aiguille », qui pourra être délivrée au besoin sans l'assistance de personnel médical.

La validation de cette approche aboutira à la mise en place d'un nébuliseur simple, portable et pertinent, permettant une application raisonnée des peptides antiviraux chez l'homme. De plus, elle présentera une preuve de concept pour une nouvelle stratégie antivirale basée sur l'aérosolisation des peptides inhibiteurs de fusion virus-cellule. Cela ouvrira la perspective de leur transposition pour lutter contre d'autres virus respiratoires enveloppés dont la machinerie de fusion est similaire au VR (grippe, virus respiratoire syncytial, virus de nipah).

Pour valider l'efficacité de nouvelles thérapies anti-infectieuses avant de les tester chez l'Homme, il est nécessaire de les évaluer dans un modèle animal pertinent. Les modèles animaux sont essentiels pour comprendre la transmission et la pathogénèse du VR et pour évaluer des nouvelles molécules protectrices et seules les espèces Primates sont sensibles au VR.

Dans le cadre de ce projet, la pharmacocinétique et la toxicité du peptide vont être évaluées dans une première étude (autre DAP). En parallèle, la virulence du virus va être testée (procédure 1). Ensuite, l'efficacité antivirale de ces peptides inhibiteurs vont être analysées (procédure 2). Le VR utilisé dans cette étude un organisme génétiquement modifié (OGM) avec de la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) afin de faciliter l'identification des tissus et cellules infectées. Le virus est donc moins virulent car son génome est plus long d'un gène.

Remplacement : La complexité des mécanismes d'infection, de réplication virale et de réponse immunitaire à la rougeole ne peut être reproduite *in vitro*. Pour évaluer l'efficacité de nouvelles protections antivirales et avant de les tester chez l'Homme, il est nécessaire de les évaluer dans un modèle animal pertinent, ici le PNH.

Raffinement: les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des volières conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long du projet, afin de détecter tout signe clinique anormal et tout signe de douleur et/ou détresse : observation clinique, évaluation du stress et de la douleur, pesée hebdomadaire. Des mesures préventives et correctives sont également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour sortir l'animal de l'étude si des effets attendus ou inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les manipulations des animaux seront réalisées par du personnel formé et compétent.

Réduction : il est prévu d'utiliser au total jusqu'à 12 PNH par an (60 animaux sur 5 ans). 2 animaux par an seront prévus pour tester la virulence du virus dans le cas où différentes souches seraient testées. Concernant l'évaluation de l'efficacité des peptides testés, un groupe contrôle (NaCl) sera composé de 2 animaux et les groupes traités seront composés de 4 animaux pour un peptide testé (possibilité de tester 2 peptides par an, soit 8 animaux). Ce nombre a été réduit au minimum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme.

13883 Chaque individu perçoit en permanence des stimuli environnementaux qui peuvent modifier de façon pérenne son comportement. Parmi eux, le stress déclenche un large éventail de réponses qui sont adaptatives quand elles sont correctement régulées. Toutefois, de par sa chronicité, le stress peut favoriser l'apparition de nombreux troubles psychiatriques, y compris une anxiété pathologique et des dépressions majeures. Le stress chronique est également lié à une inflammation périphérique qui, dans certains cas, déclenche ou aggrave les troubles mentaux résultants. Par exemple, il a été montré que le traitement anti-inflammatoire des patients dépressifs avait des effets bénéfiques chez certains patients. Par ailleurs, l'électrostimulation du nerf vague conduit à une atténuation des symptômes dépressifs chez des patients ne répondant pas au traitement médicamenteux. Le mécanisme responsable de ces effets thérapeutiques n'est pas connu mais il pourrait reposer sur les effets anti-inflammatoires puissants associés à la stimulation de ce nerf.

D'un point de vue expérimental, l'induction d'un stress social chronique (SSC) induit par défaite social chez la souris permet de reproduire chez le rongeur des troubles associés à la dépression chez l'homme (aversion sociale, anhédonie, perte de motivation, détresse anxieuse). Ces anomalies comportementales sont associées à une hyperactivité des neurones à dopamine dans le cerveau. Ce protocole de SSC est bien maîtrisé par l'équipe et est utilisé par de nombreux autres laboratoires académiques et entreprises pharmaceutiques.

Des travaux préliminaires conduits dans notre laboratoire ont montré que la production de cytokines inflammatoires était augmentée chez des souris soumises à un SSC. Par ailleurs, nous avons aussi montré que l'électro-stimulation de nerfs périphériques (vague et splénique) permettent de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires chez des souris injectées avec des lipopolysaccharide (LPS) bactériens.

Notre hypothèse de travail est que l'électro-stimulation de certains nerfs périphériques de par ses effets anti-inflammatoires pourrait permettre de restaurer, au moins en partie, les anomalies comportementales et cellulaires chez des souris exposées à un protocole de défaite sociale.

Le présent projet aura donc trois objectifs principaux :

- déterminer les paramètres de stimulation électriques des nerfs périphériques optimaux permettant de prévenir ou de restaurer tout ou partie des anomalies comportementales chez des souris exposées à un protocole de SSC ;
- déterminer les effets de la stimulation électriques des nerfs périphériques sur les neurones à dopamine, qui est une structure sensible au stress et importante pour les comportements sociaux et hédoniques ;
- déterminer la nature des neurotransmetteurs et des cellules impliquées en périphérie dans l'inhibition des anomalies comportementales chez des souris exposées à un protocole SSC par stimulation des nerfs périphériques ;

Pour parvenir à ces objectifs, notre projet sera découpé en cinq procédures :

- procédure 1 : Dans cette procédure les souris seront d'abord implantées avec des électrodes sur des nerfs périphériques (vague et splénique), soumises à un protocole de SSC puis nous comparerons les troubles comportementaux induits par le stress chez des animaux électrostimulés ou non ;
- procédure 2 : Dans cette procédure les souris seront d'abord soumises à un protocole de SSC, implantées avec des électrodes sur des nerfs périphériques (vague et splénique) puis nous comparerons les troubles comportementaux induits par le stress chez des animaux électrostimulés ou non ;
- Procédure 3 et 4: Dans ces deux procédures électrophysiologiques, nous mesurerons les changements d'activité des neurones à dopamine d'animaux soumis à un protocole de SSC ayant ou non subi l'électrostimulation des nerfs périphériques ;
- Procédure 5 et 6 : Dans ces deux procédures nous essayerons de bloquer les effets bénéfiques de l'électrostimulation des nerfs périphériques sur les troubles comportementaux induits par un protocole de SSC en administrant des antagonistes des récepteurs bêta adrénergiques et nicotiques.
- Procédure 7 et 8 : Dans ces deux procédures nous essayerons de bloquer les effets bénéfiques de l'électrostimulation des nerfs périphériques sur les troubles comportementaux induits par un protocole de SSC en utilisant des souris transgéniques invalidées pour l'expression des récepteurs β_2 adrénergiques et α_7 nicotiques sur les cellules myéloïdes et les lymphocytes T.
- Procédure 9 fera suite aux procédures 3 et 4 afin de préparer les cerveaux pour des coupes histologiques.

L'ensemble du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 3312 souris. Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R : Remplacement : La souris est le modèle animal chez lequel la complexité des structures et circuits cérébraux dérégulés par le stress chez l'homme est conservée. Réduction : L'enchaînement des expérimentations permettra de réduire au maximum les souris utilisées en arrêtant les

procédures dès que des résultats positifs auront été obtenus. Les tests statistiques sont choisis afin d'obtenir la meilleure significativité avec un minimum d'individu. Chaque souris suit le maximum de procédures envisageables sans interférence dans les résultats. Raffinement : Les résultats comportementaux dépendent directement du niveau de stress non contrôlé des animaux. Nous portons donc une attention particulière aux conditions d'hébergement et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur à leur minimum pour chaque procédure (suivi quotidien via des grilles de score en annexe, définition de points-limite précoces et adaptés).

13884 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telle que la rectocolite hémorragique, se caractérisent par une inflammation de la paroi du tube digestif. Ces maladies évoluent par poussées inflammatoires dont la durée et la fréquence sont extrêmement variables selon les patients. Les MICI sont le plus souvent diagnostiquées chez des sujets jeunes (20 à 30 ans). Toutefois, 15% des cas concernent des enfants. Si leur fréquence varie considérablement d'un pays à l'autre, les taux les plus importants sont retrouvés dans les pays industrialisés, notamment en Europe du Nord-Ouest et aux Etats-Unis (en France : environ 5 nouveaux cas diagnostiqués chaque année pour 100 000 habitants).

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif des MICI. Cependant, des médicaments anti-inflammatoires permettent, dans la grande majorité des cas, de contrôler durablement la maladie. Chez les patients dont la maladie est évolutive, les médecins instaurent rapidement un traitement immuno-modulateur, pour stopper les crises et éviter l'apparition de nouvelles lésions. Ces médicaments permettent de réguler le système immunitaire des patients et réduire l'inflammation à long terme. Bien que la physiopathologie des MICI reste encore mal élucidée, de nombreux travaux ont montré que l'inflammation intestinale chronique était accompagnée d'une production excessive d'interleukines (protéine activant le système immunitaire). La connaissance du rôle de ces interleukines dans la physiopathologie des MICI a conduit à développer des stratégies thérapeutiques visant à les inhiber. De nombreux traitements immuno-modulateurs sont donc en cours de test ; l'une des cibles, l'interleukine 7 (IL7), protéine majeure dans le développement des lymphocytes T.

Le candidat médicament évalué dans ce projet est un anticorps qui a pour cible les récepteurs de l'interleukine 7 (IL7R). Cet anticorps est actuellement en étude phase 1 chez le volontaire sain et a donc déjà fait l'objet d'une évaluation pré-clinique au préalable dans un modèle animal adulte (primate non humain (PNH)). Le but de ce projet est d'étudier l'impact de l'anticorps thérapeutique dans un modèle animal juvénile (système immunitaire immature) afin de répondre aux attentes des autorités réglementaires dans le cadre d'un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP : garantir que les données nécessaires à l'usage d'un médicament sont obtenues via des tests chez des enfants lorsqu'ils peuvent être menés sans danger).

Dans ce projet, le modèle PNH sera utilisé d'une part, pour sa grande proximité phylogénétique avec l'Homme et la similitude de ses réponses immunitaires, mais aussi pour s'inscrire dans la continuité des essais précliniques déjà réalisés chez le singe adulte préalablement aux essais cliniques chez l'Homme. Durant la période couverte par ce projet, il est prévu d'utiliser au maximum 4 singes juvéniles et autonomes par an (soit un total de 20 pour 5 ans), tous issus d'un élevage agréé. Ces animaux seront répartis en deux groupes de deux animaux. Sur la base du protocole destiné à l'Homme, les animaux recevront une injection intraveineuse hebdomadaire de l'anticorps thérapeutique (groupe traité) et de solution saline (groupe contrôle) pendant 7 semaines. Quarante-huit heures après la première injection de l'anticorps, les animaux recevront une injection d'une molécule challenge (type KLH, « Keyhole Limpet Hemocyanin »), une protéine non pathogène provoquant une réponse immunitaire prononcée. Ce boost permettra d'évaluer si l'administration répétée de l'anticorps thérapeutique induit une diminution de l'immunité chez le jeune singe. Ce modèle d'immunisation challenge au KLH a déjà été validé et publié chez le singe adulte. Des prélèvements sanguins seront effectués pour suivre l'état de santé des animaux et pour réaliser des analyses de toxicité. En fin d'étude, une autopsie sera effectuée afin de récolter les organes impliqués dans l'immunité (rate, thymus, ganglions, moelle osseuse) pour des analyses histopathologiques.

Application des 3R.

Réduction : Pour chaque procédure, 4 animaux seront utilisés (2 contrôles et 2 testés). Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats interprétables et transposables à l'Homme.

Raffinement : Dès leur arrivée, les animaux seront examinés par un vétérinaire, pour s'assurer de leur bon état de santé. Les animaux auront une période d'acclimatation d'un mois afin qu'ils s'habituent à leur nouvel environnement et qu'ils soient progressivement entraînés à la manipulation. Ils seront suivis individuellement et quotidiennement afin de détecter tout signe de douleur ou de détresse (grille d'évaluation). Bien qu'aucun signe de toxicité n'ait été observé durant les précédents essais sur des PNH adultes suite à l'administration de l'anticorps thérapeutique, les animaux seront cliniquement suivis 2 fois par jour. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress à la manipulation et une attention particulière sera donnée à l'enrichissement de leur environnement (formes et couleurs diversifiées, rotation une fois par semaine).

Remplacement : L'anticorps thérapeutique testé dans ce projet a déjà été administré chez le singe adulte. Ces études ont montré que cet anticorps diminuait l'inflammation sans induire de trouble sanguin (lymphopénie) ou de déficience métabolique. Etant donné que les MICI touchent également de jeunes enfants et dans le cadre d'un PIP, il est nécessaire de pouvoir tester ce traitement chez le singe juvénile pour évaluer le comportement du système immunitaire immature.

13885 L'État de Stress Post-Traumatique (PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique à forte prévalence dans la population générale (8 – 12%) qui, en l'absence de prise en charge adaptée, peut se compliquer en formes handicapantes et comorbides (dépression, addictions, anxiété, etc.)

Le PTSD se développe à la suite du vécu d'un événement traumatisant et va induire un certain nombre de symptômes. On retrouve ainsi chez les patients un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement des stimuli associés au traumatisme, une activation neurovégétative et enfin des troubles de l'humeur et de la cognition. De plus il a été noté des modifications cérébrales notamment dans le cortex préfrontal (CPF), l'amygdale et l'hippocampe. L'implication de l'hippocampe dans la vulnérabilité à cette pathologie a été bien documentée. Or, au sein de l'hippocampe, de nouveaux neurones sont formés à l'âge adulte. On peut donc penser que ces néoneurones pourraient être impliqués dans la vulnérabilité à développer un PTSD.

Pour une étude approfondie de cette pathologie et notamment de l'implication des néoneurones dans le développement de celle-ci, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaire. Le modèle murin de PTSD le plus classique repose sur l'application de chocs électriques. Ce protocole de conditionnement de peur contextuelle provoque des modifications comportementales durables (évitement, immobilisation, sursaut exagéré, anxiété accrue), associées à la symptomatologie et aux altérations neurobiologiques chez l'humain. Par ailleurs, chez l'animal il est possible d'induire expérimentalement de la neurogenèse. En effet il existe une souche de souris transgéniques développée récemment, chez lesquelles il est possible d'induire une augmentation de la neurogenèse à un moment voulu grâce à une injection de Tamoxifène activant la mutation génétique.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une augmentation de la neurogenèse adulte sur l'activité des circuits neuronaux touchés dans le PTSD. Nous avons précédemment mis en évidence qu'une augmentation de la neurogenèse avait comme impact une diminution des comportements de peur et d'anxiété, cependant, les mécanismes et circuits neuronaux qui sous-tendent ces effets restent à déterminer. Pour étudier cela, nous allons inhiber l'activité des projections de l'hippocampe. En effet, la diminution des symptômes observés après une augmentation de la neurogenèse pourrait être sous-tendue par l'activité de ces projections hippocampiques.

Nous testerons 8 lots expérimentaux, qui se distingueront par 3 facteurs : le fait d'avoir ou non subi le stress traumatique, le fait d'avoir ou non subi l'administration de Tamoxifène (qui active la

construction génétique) et enfin le fait d'inhiber ou non l'activité des projections de l'hippocampe. Ainsi, il y aura $8 * 20 = 160$ souris. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude : Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après et 24-48 suivant l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire. Le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté.

Remplacement Ce modèle s'intéressant au comportement animal, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement (par exemple, une étude *in vitro*) n'est envisageable. Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle ($n=20$ sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

13886 Le cancer du foie est la deuxième cause de mortalité liée au cancer dans le monde et représente un problème de santé publique majeur. Il existe 3 types de cancers primitifs du foie. Le premier, le plus fréquent (80% des cancers du foie), est le carcinome hépatocellulaire (CHC) qui dérive des cellules principales du foie, les hépatocytes. Le deuxième cancer du foie le plus fréquent (10-15% des cas) est le cholangiocarcinome intrahépatique (CCK) qui dérive des cellules biliaires. Le dernier cancer du foie, l'hépatocholangiocarcinome (CHC-CCK) l'entité la plus rare (1-5% des tumeurs), est un cancer mixte présentant à la fois les caractéristiques du CHC et du CCK. Pour ces cancers, les traitements les plus efficaces sont la résection chirurgicale de la tumeur ou la transplantation hépatique cependant la découverte tardive de la tumeur et le manque de donneurs ne permettent de traiter qu'environ 30 à 40% des patients. Pour le CHC et le CCK, il existe d'autres alternatives médicamenteuses ou interventionnelles. Cependant, pour les patients atteints de tumeurs mixtes, il n'existe pas d'alternatives à la résection chirurgicale ou la transplantation hépatique.

Récemment des thérapies ayant pour but de restaurer l'activité antitumorale du système immunitaire ont été développées pour le traitement du CHC. En effet, la caractérisation de l'environnement tumoral a démontré la surexpression de certaines protéines empêchant l'activité immunitaire antitumorale. Deux de ces protéines sont les protéines « Programmed death-ligand 1 » (PD-L1) et « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA-4). Les études cliniques ont démontré que, dans le CHC, l'inhibition de ces protéines par des thérapies permettait d'augmenter la survie des patients de plusieurs mois. Dans ce projet, nous souhaitons déterminer si les patients atteints de tumeurs mixtes CHC-CCK sont éligibles à ces thérapies ciblant PD-L1 et CTLA-4.

Chez l'Homme, nous avons démontré sur 20 patients atteints de CHC-CCK que ces tumeurs mixtes possédaient une expression des protéines PD-L1 et CTLA-4 similaire au CHC. Les tumeurs mixtes semblent donc être des bons candidats pour les thérapies ciblant ces protéines. Afin de confirmer le potentiel de ces thérapies dans le traitement des CHC-CCK, nous souhaitons tester ces thérapies sur un modèle murin développé au sein de notre laboratoire. Ce modèle murin consiste en une greffe sous-cutanée de cellules progénitrices intrahépatiques. Les cellules progénitrices intrahépatiques ont la capacité de se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires, et en présence chronique d'IL-17 de former des tumeurs mixtes. Nous allons utiliser dans cette procédure un nombre total de 75 souris.

• Règle des 3Rs (Réduire, Remplacer, Raffiner) :

1/ Remplacer les animaux : *Ex vivo*, sur des coupes de tumeurs mixtes, nous avons observé une forte expression de PD-L1 et de CTLA-4, confirmant l'hypothèse que ces protéines sont potentiellement impliquées dans l'inhibition de l'immunité antitumorale comme démontré dans le CHC. Afin de confirmer cette hypothèse, il nous est indispensable de disposer d'un modèle avec une immunité intacte afin de déterminer si dans ce type de cancer la stratégie inhibant ces protéines permettrait de restaurer l'activité antitumorale des cellules immunitaires.

2/ Pour réduire le nombre de souris utilisées : L'étude se déroulera en deux phases. La première phase sera réalisée sur un nombre restreint de souris (19 souris). L'étude pilote permettra la mise au point du protocole de greffe (nombre de cellules greffées et étude de la cinétique de croissance tumorale). La phase deux consistera en une étude pré-clinique des thérapies ciblant PD-L1 et CTLA-4 sur 56 souris. Nous souhaitons démontrer que ces thérapies sont des traitements à considérer pour le traitement des tumeurs mixtes CHC-CCK.

3/ Raffiner les méthodes : Les animaux seront hébergés par 5 maximum en cages de 5 souris de taille réglementaire avec eau et nourriture *ad libitum*.

Les animaux seront observés quotidiennement et les tumeurs seront mesurées deux fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse dès leur l'apparition et durant toute la durée du protocole. De plus, la mesure de leur poids sera réalisée une fois par semaine. Les souris ayant une perte de poids de plus de 20% du poids du corps d'un animal contrôle seront euthanasiées. Si un comportement anormal des souris est observé (posture, position des oreilles, fermeture de l'œil), elles seront également euthanasiées. Les souris ayant un volume individuel de la tumeur supérieur à 1500 mm³ ou présentant une ulcération/infection à l'emplacement de la tumeur seront euthanasiées.

Le but général de ce projet est de valider l'efficacité de la stratégie thérapeutique consistant à l'inhibition de CTLA-4 et PD-L1 dans le CHC-CCK. Ces travaux pourraient, à terme, permettre d'étendre les patients éligibles aux traitements ciblant CTLA-4 et PD-L1, déjà en étude clinique dans le CHC.

13887 La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus commune dans le monde occidental, elle affecte principalement des patients âgés et elle est encore incurable sans greffe de moëlle osseuse.

Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides thérapeutiques, séquence d'acides aminés, sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages. Leur utilisation peut être proposée à la fois pour la délivrance de produits thérapeutiques mais également comme molécule thérapeutique de part leurs propriétés anti-tumorales. L'utilisation de ces peptides est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, ils présentent une faible toxicité et ne déclenchent pas de réaction immunitaire.

L'objectif de ce projet est d'évaluer 3 peptides thérapeutiques. Le premier peptide a déjà été évalué *in vivo* dans une précédente demande. Bien qu'ayant démontré qu'il augmentait la survie des souris, il ne permet pas une guérison complète des souris. Des mutations de ce peptide ont donc été réalisées. Parmi les mutations effectuées, deux ont permis *in vitro* d'augmenter son efficacité thérapeutique mais également sa stabilité dans le sérum (liquide sanguin débarrassé de ses cellules et des protéines de la coagulation) en diminuant sa dégradation par les enzymes sériques (protéines présentes dans le sérum qui coupe les séquences d'acide-aminés).

L'objectif de ce projet est d'étudier l'activité thérapeutique de ces deux peptides mutants à celle du peptide original et au groupe témoin. Nous utiliserons un nombre maximum de 78 souris greffées par la LLC afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider les activités thérapeutiques de ces trois peptides.

L'ensemble de ce projet respecte la règle des 3R (principes de remplacement, de réduction et de raffinement). Les peptides ont été évaluées dans un premier temps *in vitro* sur cellules fraîches de patients atteints de LLC et sur la lignée cellulaire immortalisée utilisée dans ce projet (principe de remplacement). Le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les

objectifs du projet (principe de réduction). Le bien être des animaux est primordial durant ce projet, les souris sont hébergées selon les normes de soins et d'hébergement mentionnées à l'article R. 214-95 du code rural et de la pêche maritime. Elles sont logées en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Les souris disposent d'un espace suffisant avec des cages répondant à la réglementation et enrichies d'igloos. Les souris, après avoir observé une phase d'acclimatation, sont incluses dans la procédure expérimentale, elles bénéficient d'un suivi quotidien approprié pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

13888 Le rein contrôle la composition ionique de l'organisme en adaptant à ses besoins l'excrétion des ions, de l'eau et des déchets dans l'urine. Cette fonction est rendue possible grâce à un grand degré de complexité des cellules épithéliales rénales. En particulier, le canal collecteur qui est situé dans la partie finale du néphron et qui joue un rôle crucial dans la régulation fine de l'homéostasie, est caractérisé par un épithélium hétérogène. On distingue ainsi les cellules principales et les cellules intercalaires. Elles sont impliquées dans les équilibres qui permettent au rein d'excréter des déchets de l'organisme tels que des ions ou des acides. Ces cellules s'adaptent à la charge alimentaire en acide ou en ions permettant alors aux reins de les excréter en quantité variable dans l'urine. Dans ce projet, la régulation de la fonction des cellules du canal collecteur ainsi que leur formation et leur signature moléculaire seront évaluées lors de l'adaptation à différents régimes alimentaires (régimes riche et pauvre en sodium et en potassium). Des souris génétiquement modifiées qui permettent de suivre le devenir de ces cellules rénales seront utilisées. 438 souris seront nécessaires à ce programme de recherche de 5 ans.

Le rein est un organe complexe composé de multiples types cellulaires interagissant les uns avec les autres. Un modèle animal pour l'étude de ce système intégré est nécessaire pour tester nos hypothèses. De plus, aucun modèle cellulaire n'est disponible pour les cellules rénales spécialement les cellules intercalaires. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum dans le respect de la règle des 3R sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter d'anticiper tout signe de souffrance.

13889 Chez les céphalopodes (pieuvres seiches calmar), le système visuel est un élément crucial dans la survie et la reproduction des individus. Les seiches se sont adaptées à des milieux où la visibilité est réduite à cause de la turbidité. Ce projet vise à déterminer le développement des performances visuelles chez des seiches (*Sepia officinalis*) élevées dans des milieux plus ou moins turbides. Ce projet a pour but : 1/d'évaluer les conséquences potentielles de l'augmentation de la turbidité en milieu naturel 2/déterminer si les juvéniles élevés en milieu turbide vont développer des compétences visuelles spécifiques qui vont compenser la faible visibilité du milieu 3/de déterminer si l'absence de turbidité de l'eau utilisée en élevage et en laboratoire pourrait avoir des effets délétères sur le développement du système visuel et le bien-être des individus. Toutes les dispositions sont mises en oeuvre pour respecter les 3R : 1-les procédures ne sont pas invasives, on observe des comportements naturels pour l'espèce, les conditions expérimentales correspondent à des situations écologiques 2-les effectifs correspondent aux minima requis pour utiliser des méthodes statistiques nonparamétriques, leur robustesse est optimisée en utilisant des répliques 3-Il n'existe à l'heure actuelle pas de méthodes/d'espèces substitutives aux seiches vivantes pour étudier systématiquement leurs comportements. Ces recherches s'inscrivent en outre directement dans les travaux qui visent à améliorer les pratiques liées au maintien des seiches en stabulation. Les quatre procédures décrites dans cette saisine visent à évaluer le développement des compétences visuelles des jeunes seiches : Objectif 1 : évaluation des compétences visuelles en milieu turbide Procédure 1 : capacités à imiter la couleur de substrats complexes dans 2 conditions de turbidité. Observations des comportements Procédure 2 : distances de détection des proies dans 2 conditions de turbidité. Observations des comportements Objectif 2 : développement de capacités visuelles spécifiques : sensibilité à la lumière polarisée Procédure 3 : capacité de

discrimination de motifs contrastés ou polarisés. Test optomoteur, Observations de comportements. Objectif 3 : détermination des conditions de turbidité préférées en élevage Procédure 4 : préférences individuelles pour des zones turbides vs non turbides. Test de choix (choice tank). Observation des comportements (temps passé dans chaque zone) Ces tests seront effectués à la naissance, à 1 semaine, 1 mois, 2 mois et 3 mois (les trois premiers mois de vie sont cruciaux dans la maturation du système visuel). Les seiches seront élevées dans trois conditions : deux avec une eau rendue turbide par de l'ajout de limons naturels (0,1g/litre (A) et 0,5g/litre (B) respectivement) et une avec de l'eau claire (C). A est la concentration moyenne mesurée en mer par une bouée (SOMLIT®) déposée en mer aux environs des zones de pontes et B correspond aux pics de turbidités en milieu naturel induits par les courants ou l'activité anthropique, C correspond à l'eau utilisée en élevage. Les mêmes individus seront soumis à chacune des 4 procédures aux âges sus-cités (étude longitudinale). Effectif des animaux testés : 185. Les tests seront également menés sur des animaux élevés au CREC en routine (50 individus de 6 mois à 1 an) afin d'estimer les compétences d'animaux sub-adultes élevés en conditions standards (valeurs références). Pour les études développementales, 15 seiches seront étudiées par réplica (3), donc n=45 par condition. Les seiches proviendront d'oeufs prélevés sur unedizaine de pontes en Manche. Afin de minimiser les conséquences écologiques des prélèvements, les prélèvements n'excéderont pas 2,5% d'oeufs par ponte (chaque femelle pond jusqu'à 600 oeufs). Les juvéniles seront élevées dans une structure ayant reçu l'agrément de la DDPP. Le suivi quotidien de tous les animaux sera effectué par du personnel qualifié et expérimenté, en accord avec les règles éthiques et celles du respect du bien-être animal (Directive 2010/63/UE, arrêté 1/2/2013). Au terme des observations, les seiches seront réintégrées dans les cohortes de seiches élevées en routine au dans le Centre de Recherches. Si les effectifs de juvéniles déjà résidents sont suffisants, tous les efforts seront faits pour que le maximum d'animaux puisse être replacés en milieu naturel, après autorisation de la DDTM (Direction Départementale des Territoires et de la Mer) et en accord avec les conditions énoncées dans l'article 19 de la Directive 2010/63/UE. Les versants scientifiques du projet ont été avalisés par les tutelles locales et nationales du laboratoire.

13890 Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), touchant jusqu'à plus de 20-25% de la population adulte, est caractérisé par une fermeture cyclique des voies aériennes pendant le sommeil. Ces pauses respiratoires engendrent une hypoxie intermittente qui constitue un problème important de santé publique car elle est fréquemment associée à une fatigue diurne, une perte de productivité au travail, une survenue plus fréquente d'accidents et d'atteintes cardiovasculaires (infarctus du myocarde, athérosclérose et une mortalité élevée). Ces complications sont initiées par une dysfonction des cellules endothéliales, tapissant la paroi interne des vaisseaux, dont une augmentation anormale de perméabilité permet à des cellules sanguines ou à des lipides circulants de s'infiltrer dans la paroi des vaisseaux.

Une protéine essentielle de cette barrière endothéliale (PBE) permet aux cellules endothéliales d'adhérer entre-elles, sa dégradation est impliquée dans plusieurs pathologies avec la libération d'un fragment soluble détectable dans le sang. Rien n'est connu sur la régulation de cette protéine dans le SAOS par l'hypoxie intermittente, mais certaines voies de signalisation menant à sa dégradation sont actives chez les patients SAOS. Il est probable que la dégradation de la PBE induite par l'hypoxie intermittente augmente la perméabilité endothéliale et par conséquent favorise les complications vasculaires du SAOS.

Nous avons déjà montré sur un modèle cellulaire d'hypoxie intermittente (cellules endothéliales aortiques humaines) que le fragment soluble de la PBE est augmenté dans les surnageants des cellules exposées à l'hypoxie intermittente par rapport à celles exposés à la normoxie, et que cette dégradation de la PBE est accompagnée par une perméabilité endothéliale élevée.

Nous avons aussi détecté le fragment soluble de la PBE dans des sérums de patients SAOS à des taux supérieurs aux sujets sains, ceci est en faveur de notre hypothèse. Nous souhaitons maintenant passer sur un modèle animal (souris sensibles à l'athérosclérose soumises à l'hypoxie intermittente) afin de vérifier si l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente est causée par une augmentation de la perméabilité endothéliale, elle-même médiée par la dégradation-par

clivage- de la PBE. Pour se faire, un système permettant de stabuler les souris en hypoxie intermittente, déjà présent au laboratoire, sera utilisé.

Si l'implication de la PBE dans l'athérosclérose induite par l'HI est avérée, alors des expériences complémentaires consistant à bloquer le clivage de la PBE par des molécules pharmacologiques (préalablement testées sur des cultures cellulaires) seront réalisées sur le même type de souris soumises à l'hypoxie intermittente, afin de tenter de limiter la progression des plaques d'athérome.

Si la contribution de la dégradation de la PBE est mise en évidence dans le processus d'athérogenèse, et que l'inhibition de ce processus par certains agents pharmacologiques résulte en une limitation de la progression l'athérosclérose induite par l'HI chez la souris, alors de nouvelles stratégies thérapeutiques fondées sur l'utilisation de ces inhibiteurs seront envisageables. Un nouveau traitement permettant de prévenir une des conséquences majeures de l'apnée du sommeil, l'athérosclérose, pourrait permettre à terme de faire diminuer la morbidité et la mortalité cardiovasculaire chez les patients SAOS.

Notre projet prend en compte la règle des 3R :

La perméabilité endothéliale ne peut pas être étudiée *in vivo* chez l'Homme. Notre projet inclut de nombreuses expériences à l'échelle cellulaire, cependant la réalisation de notre projet et notamment l'étude de l'athérogenèse requiert une approche intégrée. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux dans ce cadre. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats : 8 animaux par groupe et trois inhibiteurs à tester sont prévus. La perméabilité endothéliale sera étudiée par injection et dosage de Bleu Evans, cette méthode colorimétrique n'est pas compatible avec l'analyse histologique pour l'étude du remodelage vasculaire et avec l'étude de la réactivité des artères. Nous sommes donc obligés de constituer trois groupes de souris différents, l'un pour étudier la perméabilité endothéliale, le deuxième pour étudier le remodelage vasculaire et le troisième pour étudier la réactivité vasculaire.

Après la réalisation des procédures *in vivo* et l'euthanasie des animaux, nous allons collecter les organes et tissus de ces mêmes animaux pour les utiliser au cours des études *in vitro* post-mortem, rationalisant encore ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Les souris seront suivies avec un soin particulier avec des points limites clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet de 4 ans concernera 540 souris (160 souris pour l'étude de perméabilité endothéliale, 220 souris pour l'étude du remodelage vasculaire et 160 souris pour l'étude de la réactivité vasculaire).

13891 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui survient avec l'âge et qui affecte presque 8% des personnes de plus de 60 ans. La maladie se caractérise par une difficulté à initier les mouvements et s'avère très invalidante pour les patients et leur entourage. Un traitement existe pour cette maladie, la L-Dopa, mais elle occasionne des effets secondaires qui sont eux aussi très invalidants après seulement quelques années de traitement. Il y a donc des recherches actives pour trouver de nouveaux traitements permettant de freiner l'évolution de la maladie et ainsi en diminuer les symptômes. Dans la littérature scientifique, la vitamine A, une vitamine indispensable présente dans les produits animaux, apparaît comme pouvant jouer un rôle important dans la maladie de Parkinson, mais les mécanismes sont encore mal connus. Notre projet vise à analyser si une supplémentation en vitamine A peut prévenir la maladie ou en ralentir l'évolution.

Pour cela, nous utiliserons des rats mâles de laboratoire que nous supplémenterons avec un régime enrichi en vitamine A. Nous modéliserons la maladie de Parkinson par une injection dans le cerveau d'un vecteur viral permettant la surexpression d'une protéine incriminée dans la maladie. Les capacités motrices des animaux seront évaluées tout au long de l'étude par des tests simples n'induisant pas de douleur. A la fin des expériences, les animaux seront sacrifiés pour étudier par biochimie, biologie moléculaire et histologie, l'impact de la vitamine A sur la maladie de Parkinson. Cette études multi-approche apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans les mécanismes de la maladie de Parkinson.

Dans ce projet, nous veillerons à respecter la règle des 3R:

- Remplacement: ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée étudiant l'impact de la nutrition sur le cerveau, il n'existe donc pas de méthode alternative ou substitutive adaptée aujourd'hui. Les cellules en culture ne forment pas de réseaux de neurones représentatifs de la réalité biologique et nous n'avons pas encore suffisamment de données pour utiliser des modèles informatiques. De plus, les approches expérimentales sont trop invasives pour être effectuées chez l'Homme.

- Réduction: Un nombre de 10 animaux par groupe et par expérience a été déterminé comme étant le minimum requis pour atteindre une puissance statistique suffisante. Nous testerons 2 durées de supplémentation et nous étudierons les tissus à 3 temps pour analyser l'évolution de la maladie. Ainsi, 280 rats seront utilisés au total sur une durée de 5 ans.

- Rafinement: Les rats seront hébergés par paire avec un congénère et ils bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leur cage. Leur état de santé sera vérifié quotidiennement et ils seront pesés une fois par semaine. Les animaux seront manipulés quotidiennement par les expérimentateurs pour réduire leur niveau de stress pendant les tests de comportement. Pendant les procédures chirurgicales, nous veillerons au bien-être des animaux en leur appliquant une sédation avant l'anesthésie et le début de la procédure (couverture 24h). Les animaux seront sur un tapis chauffant pendant toute la procédure, jusqu'au réveil de l'anesthésie. Avant le réveil, les animaux recevront une injection de sérum physiologique tiède pour les aider à récupérer plus vite de l'anesthésie. Les animaux seront surveillés deux fois par jour les 3 premiers jours suivant la chirurgie pour s'assurer de leur bonne récupération. Si des signes de douleur persistent après l'opération, ils recevront une dose d'anti-inflammatoire (couverture 24h), jusqu'à ce que les douleurs cessent.

Malgré toutes les précautions prises, si un animal présente des points limites à un moment de l'étude, comme une diminution du poids de plus de 20%, il sera euthanasié pour éviter toute souffrance.

Cette étude de recherche fondamentale apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans la maladie de Parkinson et pourra ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter la maladie et/ou en ralentir la progression.

13892 L'infarctus du myocarde reste l'une des causes principales de décès chaque année. Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus et à explorer de nouvelles pistes thérapeutiques. Pendant l'infarctus, une artère coronaire est obstruée, le cœur est donc privé d'oxygène et de nutriments (phase d'ischémie) ce qui lui est délétère et crée des lésions cellulaires ; mais également lors de la prise en charge clinique du patient quand l'artère du patient est désobstruée (phase de reperfusion), le cœur souffre ce qui entraîne de nouveau des lésions cellulaires. La cardioprotection regroupe l'ensemble des méthodes visant à limiter l'ensemble de ces lésions et donc de protéger le cœur, ces méthodes portent le nom de conditionnement. On parlera de pré-conditionnement s'il s'effectue avant l'ischémie et de post-conditionnement au moment de la reperfusion.

Notre laboratoire a développé un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris, largement approuvé dans la littérature, permettant d'une part de reproduire au mieux cette pathologie et d'autre part de l'étudier pour développer de nouvelles stratégies de protection. Parmi ces nouvelles stratégies, le maintien de la concentration calcique dans la cellule s'avère être primordial pour diminuer les lésions cellulaires engendrées à la fois au moment de l'ischémie et à la reperfusion de l'organe. Ce projet porte plus précisément sur un canal calcique jouant un rôle dans certaines modulations de concentration calcique des cellules.

Le but de ce projet est de préciser le rôle de ce canal dans l'ischémie-reperfusion myocardique et de tester si la modulation pharmacologique de ce canal est cardioprotectrice. L'étude visera à tester un inhibiteur et/ou un activateur en pré et en post-conditionnement. Par ailleurs, nous chercherons à mieux comprendre le mécanisme d'altération des concentrations calciques dans les différents

compartiments par une technique innovante d'imagerie basée sur l'utilisation de marqueurs spécifiques.

La séquence d'ischémie-reperfusion *in vivo* réalisée implique une chirurgie sous anesthésie générale. Il s'agit du modèle de référence pour l'étude *in vivo* et préclinique de l'infarctus du myocarde et cet acte chirurgical précis est parfaitement maîtrisé par les chirurgiens du laboratoire et fait l'objet d'une analgésie (générale et locale) et d'un suivi post-opératoire parfaitement adaptés. La chirurgie d'injection des marqueurs d'intérêt dans le cœur est entièrement réalisée sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique local.

L'étude se déroulera ainsi en 3 procédures et portera sur un maximum de 420 animaux sur 5 ans.

Prise en compte des 3R :

Remplacement : Afin de mener à bien ces investigations, nous avons mené en amont des études *in vitro* sur des modèles cellulaires pour confirmer l'intérêt thérapeutique potentiel du canal TRPV1. Il s'agit à présent de prendre en considération l'organe entier dans son environnement (technique de cardioprotection) pour cette phase pré-clinique.

Raffinement : Le modèle étant parfaitement maîtrisé, un ensemble de précautions per et post-opératoire (anesthésiques, analgésiques, soins, environnement, conservation des groupes sociaux) sont mises en place pour prévenir et supprimer toute douleur, souffrance et angoisse pouvant résulter de l'intervention.

Réduction : Outre l'évaluation statistique préalable, le projet comporte deux procédures conditionnelles (la seconde n'a lieu que si la première est concluante) et la première procédure est réalisée en deux étapes : après une première cohorte à effectif réduit, seuls les groupes prometteurs sont complétés.

13893 De tous les cancers cutanés, le mélanome est le plus grave avec une incidence qui double environ tous les 10 ans. Son fort potentiel métastatique et sa résistance aux traitements font du mélanome un des cancers les plus difficiles à traiter. Les thérapies ciblées contre le mélanome et les immunothérapies ont montré une efficacité clinique remarquable. Cependant, ces traitements sont limités à des sous-groupes de patients et les rechutes sont fréquentes. Globalement, plus de 50% des patients ont besoin de traitements supplémentaires, justifiant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le mélanome, la mise en place d'une inflammation contribue au développement tumoral en favorisant la plasticité des cellules de mélanome, l'acquisition d'un phénotype invasif et métastatique et la résistance aux thérapies ciblées. L'inflammation modifie également la réponse immunitaire anti-tumorale en perturbant les interactions entre le mélanome et les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral.

Notre équipe de recherche s'intéresse à la protéine tyrosine kinase SYK qui joue un rôle central dans la signalisation intracellulaire des cellules immunitaires au cours des réponses inflammatoires. Comme la protéine SYK est exprimée par plusieurs sous-populations de cellules immunitaires, son invalidation sélective dans une population de cellules inflammatoires nous permettra d'évaluer spécifiquement son rôle au sein de cette population au cours du développement métastatique du mélanome. Notre projet consiste d'une part à étudier comment l'expression de SYK dans cette population de cellules inflammatoires participe à la croissance et à la résistance aux thérapies ciblées de cellules de mélanome. D'autre part, nous étudierons comment le potentiel métastatique dans le poumon de cellules de mélanomes est affecté par l'expression de SYK dans les cellules inflammatoires.

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études préliminaires *in vitro* sur des lignées cellulaires de cellules inflammatoires. Cependant, il nous est nécessaire de réaliser des études *in vivo* car les études *in vitro* ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types cellulaires.

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un schéma de croisement qui génère 50% de souris contrôles et 50% de souris invalidées pour SYK ce qui évite la génération d'animaux inutiles.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en terme de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages). Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins une fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de déceler précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définies pour chaque procédure. Lorsque ce sera possible, nous aurons recours à l'utilisation de techniques d'imagerie non invasive pour suivre l'évolution de la tumeur, afin de prendre en compte et soulager au plus tôt toute douleur manifestée par les animaux. Il est à noter que les souris déficientes pour SYK dans les cellules inflammatoires ne présentent aucun phénotype dommageable comme observé dans notre animalerie (souris viables, fertiles, de taille normale et ne présentent aucune anomalie physique et comportementale) et par d'autres laboratoires.

A terme, notre projet, qui a pour but de mieux comprendre les mécanismes d'échappement tumoral au cours de la progression métastatique du mélanome, pourrait avoir d'importantes retombées cliniques. En particulier, le ciblage pharmacologique de SYK et de son activité inflammatoire pro-tumorale pourrait permettre de retarder, voir éviter, le développement métastatique et l'échappement thérapeutique des mélanomes.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est de 780.

13894 Le sommeil constitue un besoin vital pour toutes les espèces. Chez les mammifères et les oiseaux tous deux homéothermes il est classiquement divisé en deux états : le sommeil lent et le sommeil paradoxal (sommeil associé au rêve chez l'homme). Sur la base d'enregistrements de l'activité cérébrale (électroencéphalogramme), il a été montré récemment que deux états pouvaient exister chez des lézards, animaux poikilothermes. Cependant rien n'indique que ces deux états partagent la ou les même(s) fonction(s) que les deux états de sommeil des mammifères. Afin de déterminer si ces deux types de sommeil sont similaires chez les espèces homéothermes et poikilothermes, nous projetons de réaliser une imagerie cérébrale utilisant les ultrasons. Cette technique sera couplée à la mesure classique d'enregistrement de l'électroencéphalogramme. Nous enregistrerons pendant 3 nuits, l'activité de plusieurs régions cérébrales chez une espèce modèle: le dragon barbu (*Pogona vitticeps*). Cette approche multidisciplinaire et comparative nous permettra d'obtenir de nouvelles données pour comprendre les origines des deux états de sommeil et ainsi apporter des informations importantes pour décrypter le rôle du sommeil, encore largement méconnu.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement :

Le sommeil est un phénomène comportemental et physiologique complexe non modélisable. De fait l'utilisation du modèle animal est incontournable. Il n'existe donc aucune méthode alternative à la réalisation de ce projet.

2) Réduction :

Toutes les procédures expérimentales qui seront mises en œuvre ont été optimisées statistiquement, de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux (n=6) et obtenir un résultat significatif.

3) Raffinement :

Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. On adaptera les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées en réduisant le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient être ressentis par les animaux. Le bien-

être animal est assuré par la présence de personnel compétent 7J/7 pour l'observation et le soin, garantissant de plus un sommeil naturel et physiologique.

13895 Le Syndrome de Down (SD) ou Trisomie 21 (T21) est la première cause de retard mental d'origine génétique. Le SD est lié à la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21 et touche 1 naissance sur 600 à 800. Il se caractérise par des déficiences intellectuelles : les personnes atteintes de SD ayant des difficultés d'apprentissage et de mémorisation qui sont liées à des défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. L'amélioration des soins apportés aux personnes atteintes du SD a permis d'augmenter considérablement leur espérance de vie. Cette augmentation a mis en évidence chez ces personnes un risque accru de développer, de façon précoce, une maladie d'Alzheimer (MA). En effet, il a été constaté que près de 100% des personnes atteintes de SD présentent les caractéristiques de la MA à 40 ans. Cependant, les mécanismes impliqués dans le développement d'une MA dans un contexte de trisomie ne sont pas connus.

Nous avons ainsi créé différents modèles de rat et de souris trisomiques qui pourraient nous permettre d'étudier ces mécanismes. Nous souhaitons maintenant réaliser une étude moléculaire dans le cerveau de ces animaux afin de voir si ces modèles présentent bien les caractéristiques de la MA. Cela nécessite une perfusion de l'animal, procédure réalisée sous anesthésie générale afin qu'aucune douleur ne soit générée. Il s'agit de la seule technique nous permettant d'être dans les conditions optimales pour les études que nous souhaitons réaliser par la suite.

L'intérêt d'utiliser à la fois des modèles souris et rat est que cela pourrait permettre la généralisation des résultats obtenus dans le cas où ils seraient similaires entre les deux espèces. En effet, comme on le sait, il peut exister des différences entre les espèces, ce qui rend important la comparaison des résultats obtenus avec des organismes différents.

Réduction : Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux (244) estimé pour avoir des résultats scientifiquement interprétables. Dans le but d'utiliser l'ensemble des animaux produits et de prendre en compte une éventuelle dysmorphie sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement : Aucune douleur n'est attendue. En effet, ces animaux ne feront l'objet que d'une seule procédure réalisée sous anesthésie générale.

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux pour les études concernant le cerveau. En effet, il n'existe pas encore de modèle *in vitro* ou autre permettant de réaliser de la recherche fondamentale dans ce domaine.

13896 La forme atrophique de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) représente 85% des cas de patients atteints de DMLA. Elle se caractérise par une dégénérescence progressive des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) entraînant une altération irréversible des cellules photoréceptrices. Ces processus conduisent à une perte de la vision centrale. A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique permettant de prévenir ou ralentir l'évolution de cette pathologie.

Une accumulation de fer a été observée dans de nombreuses maladies dégénératives rétiniennes telles que la DMLA. Le contrôle du taux de fer dans la rétine pathologique semble être une cible thérapeutique de choix. Notre stratégie est d'utiliser une protéine qui naturellement séquestre le fer, synthétisée par les cellules rétiniennes et dont les propriétés et la structure sont parfaitement connues, la transferrine (Tf).

La thérapie génique est un moyen pour assurer une production continue et durable d'une protéine thérapeutique. Nous avons donc développé une thérapie non virale ciblant le muscle ciliaire et permettant l'expression dans l'œil de protéines thérapeutiques.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'administration par électrotransfert dans le muscle ciliaire d'un plasmide codant la transferrine (appelée Protéine 11) dans un modèle rongeur de DMLA atrophique et de préciser le profil d'expression de cette protéine dans les différents compartiments de l'œil.

L'ensemble du projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation de 1370 rats.

Ce projet a été développé en respectant la règle des 3R. Le modèle d'induction de la dégénérescence de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien par administration d'iodate de sodium est un modèle reconnu de DMLA atrophique. Il est le seul modèle expérimental permettant de démontrer l'efficacité de notre technologie car il n'existe pas de modèle *in vitro* représentatif de cette pathologie. Par ailleurs, avoir recours à un œil sur animal vivant est indispensable pour montrer que, via notre technologie, la protéine cible est efficacement produite, qu'elle diffuse depuis le muscle ciliaire jusqu'au tissu à traiter impliquer dans la pathologie et qu'elle exerce une action thérapeutique (protéine biologiquement active). Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont standardisées afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser tout en assurant des résultats statistiquement exploitables. Néanmoins, l'œil controlatéral ne servira pas de contrôle afin de nous affranchir du risque de passage, via la circulation générale, de la protéine produite vers l'œil non traité. Enfin, les procédures utilisées sont peu traumatiques, de courte durée et sont réalisées, pour la majorité, sous anesthésies générale et locale (classe de gravité légère ou modérée). Des points limites ont été identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

13897 Le déclin des capacités physiques chez les séniors est étroitement lié à la sarcopénie, un processus défini par la diminution de la masse et de la fonction (activité, métabolisme) des muscles squelettiques. Dans une optique de prévention, nous souhaitons tester l'intérêt d'une huile végétale à haute valeur nutritionnelle issue de la cameline de part sa richesse en acides gras oméga 3 et antioxydants. Ces molécules naturelles sont connues pour leurs effets anti-inflammatoires et préventifs des problèmes métaboliques. Nous pensons qu'elles permettraient ainsi de préserver l'autonomie des séniors, leurs capacités physiques, contribuant ainsi à leur qualité de vie et à la réduction des coûts de dépenses de santé.

Nous avons contribué à montrer que la qualité de l'apport lipidique alimentaire est cruciale dans le cadre de la prévention de nombreux états physiopathologiques tels que les situations de cancer, diabète, maladies inflammatoires chroniques et la sarcopénie. Sur un plan nutritionnel, les AGPI n-3, synthétisés par les végétaux terrestres ou marins, peuvent se retrouver dans des huiles végétales ou dans les tissus des animaux qui les auront consommés (Huile de lin, noix, colza, poissons gras, algues, herbe ...). L'huile de cameline est méconnue et est pourtant riche en acide alpha-linolénique (ALA), précurseur des AGPI n-3, avec un ratio AGPI n-6/AGPI n-3 faible et contient des antioxydants en bonne quantité. Le protocole proposé respecte les règles d'éthique en conformité avec la législation sur l'expérimentation animale et la règle des 3R. Les animaux vivants ne peuvent être remplacés (remplacer) par un autre modèle pour une étude nutritionnelle, qui prend en compte des aspects à l'échelle de l'organisme entier. Nous allons étudier l'impact de l'huile de cameline sur le vieillissement de souris femelles hébergées dans des conditions raffinées collectivement deans des cages aux dimensions réglementaires avec un environnement enrichi (raffiner). Pour répondre aux questions scientifiques posées, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux (réduire) à utiliser en préservant une puissance statistique raisonnable. Les effets de l'huile de cameline seront évalués dans une situation de régime de type occidental ou standard en comparaison avec ceux d'une huile riche en acides gras oméga 3 plus courante, pour un nombre maximal de 105 souris femelles C57Bl6j. Nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins (analgésiques) ou d'exclusion d'animaux en souffrance.

13898 Le cancer colorectal est la deuxième cause de décès par cancer. Si l'origine même de ce type de cancer reste controversée, l'inflammation chronique de l'intestin constitue un terrain favorable à l'émergence de ce type de tumeurs. Pour maintenir l'homéostasie intestinale et réprimer l'activation inappropriée du système immunitaire contre les quelques 10^{14} bactéries qui peuplent le tube intestinal, il existe des mécanismes régulateurs telles que des cytokines immunosuppressives dont le Transforming Growth Factor Beta (TGF- β). Si l'intestin renferme de très grande quantité de cette cytokine immuno-régulatrice, l'action du TGF-b au niveau de cet organe reste mal connue. Les

personnes atteintes d'une mutation du gène SMAD4 sont prônes à développer des polypes évoluant vers des cancers. De façon intéressante, il a été montré que la délétion spécifique de SMAD4, au sein des lymphocytes T induit une inflammation intestinale chronique évoluant en cancer de la muqueuse intestinale après l'âge de 8 mois, chez les souris. Ainsi, ces observations mettent en avant un rôle central de la molécule de SMAD4 au sein des lymphocytes T dans la régulation de l'homéostasie intestinale. Néanmoins, les mécanismes de cette régulation médiée par SMAD4 au sein des lymphocytes T restent encore énigmatiques. De plus, la molécule SMAD4 peut avoir un rôle indépendant du TGF beta.

Objectif : Dans ce projet, nous proposons de déterminer si le rôle de SMAD4 dans le contrôle de l'inflammation intestinale médiée par les lymphocytes T est dépendant du TGF beta. Pour notre étude nous utiliserons des souris déficientes ou sur-activant spécifiquement les voies de signalisation du TGF-beta au sein des lymphocytes T. Après obtention de ces lignées nous laisserons ces nouvelles lignées en vieillissement et analyserons si on observe une inflammation intestinale ou toute autre pathologie. La grande majorité de ces lignées sont déjà décrites dans la littérature. Néanmoins aucune de ces études n'a questionné l'impact sur l'homéostasie intestinale et la biologie des lymphocytes T au niveau de l'intestin.

Seules des études chez la souris, modèle où les réactifs sont adaptés et la caractérisation du système immunitaire intestinal est bien décrite, permettent de répondre au rationnel du projet dans des conditions physiopathologiques adéquates. Pour optimiser les données et réduire le nombre de souris, plusieurs personnes compétentes de l'équipe auront la charge de la récolte et de la préparation des tissus et cellules pour les différentes expérimentations. En outre pour minimiser au maximum le nombre de souris utilisées, plusieurs analyses différentes seront effectuées sur la même souris dans la mesure où cela sera possible. Des études statistiques appropriées seront effectuées permettant de réduire également l'effectif des animaux. Un contrôle régulier, fréquent et minutieux sera effectué pendant toute la durée de l'expérimentation, au cours duquel une pesée et un examen des signes cliniques évocateurs de souffrance seront recherchés. Pour ce projet, 240 souris seront impliquées sur une durée totale de 5 ans.

13899 Ce projet vise à étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la douleur migraineuse, et en particulier le rôle de certaines protéines membranaires, les canaux ioniques, en développant leur pharmacologie. Dans le cadre d'une collaboration, nous avons précédemment identifié une protéine qui inhibe des canaux perméables à l'ion K⁺ présents dans les neurones sensoriels conduisant à une hypersensibilité douloureuse impliquée dans la pathologie migraineuse. Le but de ce projet est d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de la douleur migraineuse (1) en testant les effets *in vivo* d'un activateur pharmacologique des canaux ioniques dans un modèle de migraine chez la souris pour déterminer s'il peut réduire les symptômes migraineux, (2) en comparant ses effets avec d'autres anti-migraineux connus et (3) en montrant sa spécificité d'action en comparant ses effets sur des souris dont les gènes des canaux ciblés ont été invalidés.

Le modèle de migraine proposé ici est classiquement utilisé et validé dans les études cliniques chez l'homme, puis a été appliqué aux études pré-cliniques (chez les rongeurs). Il consiste à induire des symptômes migraineux par injection systémique d'un composé dit "donneur de NO" car produisant de l'oxyde nitrique (NO) comme composé actif. Chez la souris, quatre injections (intrapéritonéale, i. p.) répétées quotidiennes induisent une hypersensibilité douloureuse cutanée de la face et aussi de tout le corps que l'on mesure sur une patte arrière grâce à la technique de von Frey (appareil de von Frey dynamique). Cela consiste à appliquer une pression sur la paume de la patte arrière avec un filament et à mesurer la pression (en grammes) induisant le retrait de la patte par la souris, traduisant ainsi une douleur mécanique. Une fois cette hypersensibilité douloureuse mécanique induite (au 5ème jour après le début du traitement avec le donneur de NO), les effets d'une injection de l'activateur des canaux ioniques d'intérêt seront mesurés et comparés aux effets d'un autre composé inhibiteur de canaux ioniques dont les effets anti-douleur ont déjà été caractérisés sur ce modèle, et aux effets de deux anti-migraineux connus utilisés en clinique. Les résultats obtenus sur les souris sauvages seront comparés à ceux observés sur les souris KO (présentant un phénotype

non dommageable), dans lesquelles on attend une perte d'effet de l'activateur par perte de sa cible pharmacologique, ce qui montrerait sa spécificité *in vivo*.

L'objectif de Réduction a été pris en compte car le nombre d'animaux total (240 souris) correspond au nombre maximal nécessaire à l'obtention de résultats significatifs (calculé par le logiciel GPower). Il sera réduit chaque fois que possible, et toute expérience rendue inutile par des résultats précédents obtenus par nous ou d'autres groupes (veille bibliographique mondiale permanente) ne sera pas conduite. Objectif de Raffinement: notre expertise dans le domaine des études de la douleur nous permet de proposer un test de sévérité modérée dans lequel on mesure une douleur seuil à laquelle l'animal peut se soustraire immédiatement par son comportement. Les souris subissent une contention brève pour réaliser les injections puis sont laissées libres de leurs mouvements pendant le test. Elles sont habituées à la contention et à leur environnement au préalable, mais, puisque la douleur est ce que nous mesurons, elles ne peuvent cependant recevoir d'analgésique ni d'anesthésiques. Objectif de Remplacement: des études *in vitro* sur des neurones en culture ont été conduites au préalable pour caractériser le profil pharmacologique de l'activateur en terme de spécificité de cible et de concentration active. Les études précliniques chez l'animal restent cependant nécessaires à la poursuite d'études cliniques pour développer de nouveaux traitements antimigraineux.

13900 Les lymphomes T périphériques sont des néoplasies hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes chez l'Homme. Ces pathologies sont souvent considérées comme des « maladies orphelines », reflétant ainsi les difficultés rencontrées pour leur classification, diagnostic et traitement. Nous avons récemment mis au point un nouveau modèle murin de lymphomes T périphériques dans lequel nous retrouvons des caractéristiques comparables aux lymphomes T humains. A savoir l'expression de marqueurs de cellules natural killer (NK) et l'utilisation de ses voies pour la survie des cellules tumorales. Des données complémentaires d'expression génique suggèrent que les lymphocytes T se reprogramment en cellules NK like. De plus de nombreuses études suggèrent que les cellules tumorales sont des cellules dé-différenciées et/ou reprogrammées. Nous souhaitons donc étudier le rôle de la reprogrammation de lymphocytes T sur la lymphomagenèse.

Les lymphomes T périphériques sont des pathologies pour lesquels nous n'avons pour le moment pas de traitement efficace. Il nous faut donc développer des outils afin de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies pour pouvoir mieux les traiter. Nous ne disposons malheureusement pas ou trop peu de lignées cellulaires permettant ces études, il nous faut donc développer de nouveaux modèles animaux. Pour cela la souris est très utile car nous disposons de modèles génétiquement modifiés permettant le développement plus rapide et une pénétrance plus importante de ces pathologies.

Les animaux seront observés 3 fois par semaine afin de mettre en évidence toute souffrance de l'animal. En cas de prostration à l'ouverture de la cage, apparition d'un gonflement de l'abdomen caractéristique d'un lymphome avec envahissement de la rate et/ou du foie, les souris seront mises à mort et nous rechercherons l'apparition de tumeurs soit dans les organes lymphoïdes ou dans d'autres organes. Toute atteinte de ces points limites entraînera la mise à mort immédiate de l'animal. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats, de plus nous conserverons par congélation les cellules lymphomateuses obtenues pour d'éventuelles analyses à posteriori limitant ainsi le nombre d'animaux.

Au total, nous aurons besoin de 324 souris pour cette étude.

13901 Le rétrécissement aortique (RA) chez l'adulte est la valvulopathie la plus répandue dans les pays développés. Sa fréquence a augmenté dans les dernières décennies due au vieillissement général de la population. Cette pathologie est caractérisée par une diminution du diamètre de la valve aortique provoquant ainsi une gêne à l'expulsion du sang en dehors du cœur vers l'aorte. Le seul traitement qui permet actuellement d'éviter une évolution fatale consiste à remplacer la valve aortique par voie chirurgicale ou percutanée. Comprendre les mécanismes d'évolution de la maladie

est un enjeu majeur pour envisager à terme un traitement médical qui ralentirait l'évolution du RA et éviterait le recours au remplacement valvulaire.

A l'heure actuelle il n'existe pas de modèle fiable de RA *in vivo* publié. Il est connu que les patients ayant eu une radiothérapie du thorax sont plus à risque de développer un RA et il a été décrit récemment que ces patients avaient une évolution de la maladie accélérée en comparaison aux autres patients atteints de RA. Il a également été décrit que l'irradiation de cellules de la valve aortique en culture entraîne le processus de calcification en cause dans le RA, jetant les bases pour le développement d'un modèle *in vivo*. Nos résultats préliminaires sur la mise en place un modèle *in vivo* montrent un remaniement de la valve aortique après irradiation. Cependant, pour mimer la maladie humaine, il nous faut confirmer que cette anomalie de la valve s'accompagne d'une hypertrophie du muscle cardiaque.

Ce projet propose l'ensemble des procédures permettant d'induire des calcifications de la valve aortique par radiothérapie, de caractériser une hypertrophie cardiaque associée, et d'évaluer l'efficacité d'un traitement médical visant à limiter les calcifications de la valve aortique. Il s'agit donc d'un premier pas vers un traitement médical de la maladie. Dans ce cadre, le remplacement de l'utilisation des animaux est impossible. Afin de sensibiliser l'activation des mécanismes de calcification, nous utiliserons une souche de souris transgénique ApoE^{-/-} qui présente une athérosclérose précoce, sans nécessité de régime particulier.

L'ensemble du projet inclura 90 animaux. Premièrement, au maximum 30 animaux sont utilisés pour former un groupe non traité. Parmi ce groupe, il y aura un sous groupe de 15 animaux irradiés versus 15 animaux non irradiés. Deuxièmement, deux groupes de 30 animaux bénéficieront d'un traitement médical, chaque groupe étant constitué de deux sous groupes de 15 animaux, l'un irradié et l'autre non irradié. Parmi les lots irradiés, un seul schéma d'irradiation sera utilisé. Les animaux seront suivis par des examens non invasifs: (i) échographie pour évaluer les conséquences de l'irradiation sur le myocarde et l'aorte, (ii) IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) pour évaluer l'inflammation sur le myocarde et l'aorte, et (iii) TEP (Tomographie par Emission de Positons) au Fluorure de sodium (NaF) pour évaluer le processus de minéralisation au niveau de la valve aortique. Enfin, à la fin du projet, les animaux seront mis à mort afin d'effectuer une analyse histologique de la valve et du myocarde.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV) avec une pression de 20-25Pa avec un renouvellement de 25 fois le volume d'air de la pièce toutes les heures et une température de 21°±1C. L'exposition à la lumière sera de 6h45 à 18h45. La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. La litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux permet de réduire le niveau de stress. Cette litière est plus chère mais possède les avantages d'être peu poussiéreuse, moins allergisante que le résineux. Les animaux sont hébergés par groupe de 5 afin de conserver les interactions sociales. La litière est enrichie avec de la litière cellulose Alpha Dry permettant la confection de nid. A la suite des procédures, un suivi régulier est effectué pendant 5 jours par du personnel formé et expérimenté. Des éventuels signes de souffrance seront surveillés étroitement après irradiation. L'apparition d'une perte de poids (plus de 10% de perte par rapport au poids avant irradiation), l'aspect des poils et le comportement de l'animal par rapport à ses autres congénères seront surveillés étroitement (matin et soir) pendant 1 semaine après l'irradiation.

13902 Contexte justification, description du projet

Les formations spécifiques en expérimentation animale constituent une obligation réglementaire à laquelle doivent se soumettre tous les acteurs de la recherche *in vivo* afin d'acquiescer les outils nécessaires à la mise en place d'une démarche éthique prenant en considération la sensibilité animale. Ces formations ont ainsi pour objectif de sensibiliser les personnels impliqués afin de minimiser les contraintes imposées aux animaux lors des procédures expérimentales. Ceci implique notamment un enseignement pratique comprenant une première approche des techniques de contention et de manipulation de l'animal à laquelle s'ajoute l'apprentissage de gestes peu invasifs courants (prise de sang, injection sous-cutanée...). Le projet soumis concerne une formation

dispensée aux personnes réalisant les procédures expérimentales sur animaux qui s'inscrit dans ce cadre réglementaire et éthique et a été soumise à l'approbation du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Les travaux pratiques proposés dans cette formation permettent aux personnels d'apprendre à mettre en oeuvre différents gestes de base, encadrés par des formateurs expérimentés.

Espèces, sexe, âge, effectifs concernés

Les animaux utilisés sont des rats et des souris adultes. Le sexe des animaux n'a pas d'incidence dans le projet, des mâles et des femelles seront utilisés indifféremment. On utilisera une souris et/ou un rat par étudiant. La projection d'activité est de quatre sessions de 20 étudiant par an sur 5 ans, soit au total 400 souris et 100 rats pour former 400 étudiants dont certains auront la possibilité d'avoir été formé à la manipulation à la fois du rat et de la souris.

Moyens mis en oeuvre pour satisfaire aux exigences de remplacement réduction raffinement

Remplacement : les manipulations sur les animaux sont précédées d'une session de 1h30 de travaux dirigés incluant un ensemble de présentations et démonstrations sur vidéo et maniquin

Réduction : les animaux utilisés pour ces TP sont des souris et des rats surnuméraires de production en interne à l'établissement et qui auraient dû être euthanasiés.

Raffinement : Toutes les techniques enseignées feront d'abord l'objet d'une démonstration par un opérateur expérimenté. Un encadrant par groupe de cinq stagiaires.

Plus précisément, après contention de l'animal pour des examens courants, le stagiaire s'essaiera à la contention adéquate pour un gavage, et une injection intra-péritonéale du serum physiologique, toujours accompagné et sous la supervision d'un encadrant.

Puis, dans un deuxième temps, effectue l'injection d'un anesthésique (mélange xylazine 100 mg/kg + kétamine 10 mg/kg), place la souris sur un tapis chauffant afin de permettre l'observation des phases de l'anesthésie, s'assurer de l'état de profondeur de celle-ci, puis réalise une injection sous-cutanée, et une injection intradermique de sérum physiologique et réalise un prélèvement de sang à la queue. Après ces manipulations l'animal, toujours anesthésié, reçoit une surdose du mélange anesthésique (300 mg/kg) en intra-péritonéal. Une dislocation cervicale est ensuite pratiquée et suivie d'une autopsie complète de l'animal permettant d'observer son anatomie et de réaliser divers prélèvements d'organes.

Afin de limiter le stress des animaux, ceux qui ont été utilisés pour les démonstrations ne seront pas réutilisés pour le reste des travaux pratiques. Ensuite, les mêmes animaux seront utilisés pour l'ensemble des techniques abordées, en commençant par les gestes les moins invasifs.

Les personnes encadrant les travaux pratiques seront particulièrement attentives à tout signe de douleur ou de détresse de l'animal. Si un animal présente des signes de souffrance, la procédure en cours sera immédiatement interrompue et une personne compétente prendra la décision adéquate pour l'animal (euthanasie si nécessaire).

13903 Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes qui touchent près de 3/100 000 personnes par an en France. Elles se caractérisent par un blocage de maturation des précurseurs hématopoïétiques et leur prolifération excessive dans la moelle osseuse. Le traitement actuel repose sur une chimiothérapie visant à réduire la masse des cellules leucémiques et qui conduit dans 50 à 80 % des cas à la rémission complète selon l'âge des patients traités et le type de LAM les affectant. Néanmoins, et malgré des chimiothérapies de consolidation, une rechute peut intervenir dans plus de 50 % des cas dans un délai de 2 à 24 mois. Le développement de thérapies complémentaires s'avère donc nécessaire et, ce projet se focalise sur le développement d'une approche permettant de renforcer la réponse immunitaire afin de favoriser l'élimination des cellules leucémiques. En effet, l'objectif de notre étude consiste à mieux comprendre les mécanismes pouvant conduire au déficit immunitaire observé au cours de la leucémie et plus particulièrement, ceux responsables de l'atteinte du thymus, organe géniteur des lymphocytes T. En effet, un répertoire T biaisé en faveur de l'expansion de certaines sous-populations clonales T ainsi qu'un nombre réduit de lymphocytes T naïfs circulants ont été mis en évidence chez les patients. La

difficulté d'étudier le devenir du thymus chez ces patients et l'absence de modèle expérimental de lymphopoïèse T *in vitro* nous ont conduit à utiliser un modèle animal expérimental de LAM de souris disponible au laboratoire. Ce dernier est basé sur l'injection d'une lignée leucémique C1498 à des souris syngéniques C57BL/6J ou congéniques C57BL/6J. Ly5. 1. Ces souris développent la LAM de façon homogène ce qui réduit la variabilité entre les différents groupes d'animaux et les différentes expériences. Les résultats obtenus à ce jour à l'aide de ce modèle, nous ont d'ores et déjà indiqué que la chimiokine CCL2 contribuait à l'atrophie thymique observée lors des LAM. Ces données nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés pour cette étude à 270 (126 souris syngéniques et 144 souris congéniques). Nous souhaitons, dans ce projet, approfondir les mécanismes d'action de la chimiokine CCL2 dans l'atrophie thymique au cours de la LAM *in vivo*. Pour cela, nous évaluerons l'expression des récepteurs de CCL2 sur les sous-populations de thymocytes et les cellules stromales thymiques à différents temps de la LAM. Nous analyserons ensuite la prolifération, la mort des cellules thymiques et l'expression de facteurs de transcription et de molécules impliqués dans la thymopoïèse au cours de la LAM en présence ou non de la neutralisation de la protéine CCL2. Les injections de l'anticorps anti-CCL2 ou de son isotype contrôle n'entraînent pas de douleur ou de souffrance des animaux. Les injections de l'anticorps anti-CCL2 ou de son isotype contrôle n'entraînent pas de douleur ou de souffrance des animaux. Un seuil d'arrêt de l'expérimentation a été défini pour les souris injectées avec les cellules leucémiques : elles seront euthanasiées dès les premiers signes de souffrance liés au développement de la LAM. Néanmoins, du fait des cinétiques incluses dans ce projet, certains animaux injectés avec la lignée leucémique seront euthanasiés avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Nos résultats devraient ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de renforcer la réponse immunitaire anti-leucémique.

13904 Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie *in vivo*. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, nous prévoyons d'utiliser 9 modèles murins pour les myopathies congénitales (et 1 lignée de souris WT). L'utilisation de souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie *in vivo*.

Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REMPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une /jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris / groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Un maximum de 4800 souris sera utilisé.

13905 L'infarctus du myocarde est l'une des principales causes de décès dans les pays industrialisés, et nécessite une prise en charge précoce pour réduire la perte de la fonction cardiaque. Dans le cas de l'infarctus du myocarde, le manque d'apports nutritifs engendré par l'obstruction d'un vaisseau du cœur va conduire à une perturbation du métabolisme qui à terme se traduira par une perte de la fonction contractile cardiaque.

Dans l'organisme, il existe un lien étroit entre la circulation sanguine et le métabolisme du glucose. Nous souhaitons étudier la rupture de ce lien survenant lors de ce processus pathologique. Jusqu'à

présent aucune étude n'a suivi l'évolution du métabolisme du glucose combiné à la fonction contractile et tissulaire au moment où se produit l'infarctus du myocarde.

Ce projet de recherche vise à caractériser le lien entre la microcirculation et le métabolisme glucidique lors de l'infarctus du myocarde par un système hybride d'imagerie du vivant médicale simultanée.

Seule l'expérimentation *in vivo* chez des animaux permet de reproduire fidèlement la physiopathologie de l'infarctus du myocarde. Ces nouvelles explorations fonctionnelles vont permettre de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs. Le suivi non invasif et sur du long terme des animaux s'inscrit dans une optique de réduction du nombre d'animaux puisque l'animal sera son propre témoin.

Pour éviter toute souffrance, le modèle animal est induit chirurgicalement sous anesthésie générale par ligature définitive ou transitoire de la coronaire, sur deux espèces : un modèle souris mâle C57BL/6J et un modèle rat Wistar femelle. Il est nécessaire de travailler sur ces deux espèces, parce que la technique d'imagerie développée par le laboratoire est optimisée chez le rat. De ce fait, il s'agirait dans un premier temps de caractériser le lien entre la microcirculation et le métabolisme glucidique chez ce modèle avant d'optimiser la technique chez la souris qui est le modèle le plus utilisé pour étudier la physiopathologie de l'infarctus cardiaque.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en respectant les règles de statistique. Au total 120 animaux seront étudiés pour ce projet pour une période de 5 ans : 60 rats et 60 souris.

Les animaux seront suivis par imageries au moment de la ligature de la coronaire (J0) afin d'observer les phénomènes précoces de l'obstruction de l'artère, puis à J1, J3, J7, J14 et à 1 mois. Ce suivi se fera avec deux modalités d'imageries médicales : la scintigraphie afin d'observer la captation du glucose par le cœur et une méthode d'échographie ultrarapide et d'échocardiographie haute résolution afin de caractériser la fonction et vascularisation cardiaques.

Le comportement des animaux sera surveillé quotidiennement afin de détecter tous signes éventuels de douleurs. L'administration d'un analgésique adapté sera prévue. En cas de non-récupération de l'animal, une mise à mort anticipée sera pratiquée.

A terme ce projet permettra de valider ces deux méthodes d'imageries pour une utilisation en recherche clinique et de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs.

13906 La sénescence est un processus caractérisé par un arrêt irréversible de la prolifération des cellules, induit par différents stress. Ce mécanisme est classiquement étudié comme un puissant suppresseur de tumeur mais est également associé au développement de nombreuses maladies humaines et au vieillissement cellulaire. Récemment, il a été montré que la sénescence pouvait aussi jouer un rôle dans des événements physiologiques du développement de l'embryon, pour éliminer des tissus transitoires tels que les espaces entre les doigts de la main.

Nous pensons que les cellules sénescents, via les nombreuses molécules qu'elles sécrètent, sont capables également dans la période de vie postnatale d'aider au remodelage des tissus. Nous souhaitons étudier cette hypothèse dans la glande mammaire, un organe enclin à un remodelage massif tout au long de la vie adulte. En effet, pendant la gestation, les alvéoles mammaires sont massivement développées pour produire du lait et nourrir les nouveau-nés. Une fois les petits sevrés, ces structures deviennent superflues et sont éliminées par un processus de remodelage appelé involution mammaire. Cet événement est finement contrôlé et se termine lorsque la glande mammaire retrouve son état pré-gestationnel. La glande est alors prête pour une gestation ultérieure.

Pour étudier l'implication de la sénescence dans l'involution de la glande mammaire, nous ne pouvons pas utiliser la culture cellulaire *in vitro*. En effet, nous n'avons pas réussi pour le moment à mimer fidèlement l'organisation 3D du tissu et à reproduire une période de lactation et d'involution de la glande. Nous souhaitons donc utiliser la souris comme organisme modèle. Cet animal présente de nombreux avantages pour notre étude. C'est un mammifère dont l'organisation du tissu mammaire est similaire à celle de l'être humain. De plus, la souris possède 5 paires de glandes

mammaires, nous permettant de réaliser à partir d'une seule souris de nombreuses analyses et réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

Pour la réalisation de ce projet sur 5 ans, nous souhaitons utiliser 230 femelles âgées de 2 à 4 mois. Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type et nous avons réduit au maximum le nombre de souris pour avoir une puissance de tests significative tout en tenant compte des aléas du projet (gestation avec une portée trop petite, abandon de la portée par la femelle qui ne rentre pas en lactation...).

Ces souris seront réparties dans 5 procédures expérimentales de sévérité modérée. Pour réduire le stress des souris en involution après le retrait des portées, les femelles seront regroupées par deux à minima, limitant ainsi leur isolement. De plus, nous enrichirons l'environnement des souris par l'ajout de coton et d'un igloo dans chaque cage. Nous essayerons également d'éliminer les cellules sénescentes grâce à l'utilisation de drogues spécifiques. Ces drogues seront délivrées aux souris par gavage ou par injection. Les drogues ont déjà été utilisées dans le laboratoire et ne semblent pas induire de dommages particuliers aux animaux. Néanmoins, les souris seront surveillées quotidiennement pour vérifier leur état de santé et seront mises à mort si leur état se détériore.

L'ensemble de ce projet nous permettra de mieux comprendre la capacité spectaculaire de remodelage de la glande mammaire et son aptitude à être régénérée après chaque cycle de gestation. Les cellules sénescentes ont un rôle bénéfique lorsqu'elles agissent de manière transitoire dans un tissu. Cependant, leur accumulation est connue pour être néfaste, créant un environnement pro-tumoral via les molécules qu'elles sécrètent. Nous pensons que l'accumulation des cellules sénescentes, mal éliminées lors de l'involution, pourrait avoir un effet délétère dans le tissu mammaire et contribuer à l'apparition d'un cancer du sein associé à la grossesse, une forme de cancer du sein très agressive apparaissant chez la femme dans les 5 ans après une grossesse.

13907 Le cortex cérébral des mammifères est une structure complexe comptant des millions de neurones générés principalement pendant la période embryonnaire grâce au processus de neurogenèse. Chez l'homme, la perturbation de la neurogenèse peut provoquer des malformations congénitales du cortex responsables d'épilepsie, de retards mentaux, de troubles cognitifs divers. C'est un processus sophistiqué qui fait intervenir de nombreux partenaires moléculaires encore très mal définis.

Nos travaux visent à comprendre le rôle fondamental d'une protéine nouvellement identifiée dans la neurogenèse chez l'embryon de souris. Nous disposons d'un modèle de souris génétiquement modifiée dans lequel notre gène d'intérêt est inactivé spécifiquement dans les cellules à l'origine des neurones du système nerveux central. Des résultats préliminaires nous ont montré que l'inactivation de ce gène modifiait le nombre de neurones produits dans le cortex de l'embryon à des stades précoces. Afin de préciser ces défauts de neurogenèse, nous souhaitons pouvoir analyser les conséquences de l'inactivation de ce gène à plus long terme, à différents stades embryonnaires et après la naissance, sur l'organisation anatomique du cortex cérébral et le nombre de neurones générés. Pour cela nous effectuerons une injection intrapéritonéale unique à des souris génétiquement modifiées gestantes à un stade donné d'une solution d'une molécule qui permet de repérer les neurones en cours de génération. Un à sept jours embryonnaires plus tard, la mère gestante sera anesthésiée et euthanasiée selon les procédures réglementaires pour prélever les embryons pour des analyses histologiques. Des nouveaux-nés seront aussi euthanasiés 4 jours après leur naissance pour des analyses histologiques. L'injection intrapéritonéale du composé en solution physiologique n'est pas douloureuse et n'a pas de conséquence délétère sur la santé de la mère et des embryons. Le phénotype des embryons et des jeunes souriceaux génétiquement modifiés « mutants » n'est pas dommageable. Le phénotype des individus génétiquement modifiés contrôles n'est pas dommageable. Cette étude nécessite le maintien d'une lignée transgénique pour générer les parents impliqués dans l'étude. Le phénotype des parents n'est pas dommageable.

Le cortex cérébral étant caractéristique des mammifères et les protocoles de culture *in vitro* ne permettant pas de reconstruire un cortex typique, nous sommes contraints de travailler sur des souris à différents stades embryonnaires et post-nataux.

Le projet se déroulera sur 5 ans. Au total, 94 individus seront concernés dans cette étude. Ce chiffre inclus les femelles gestantes des portées soumises à l'injection. Dans le cadre de la démarche des 3R, plusieurs dispositions sont prises. L'effectif est calculé grâce à une optimisation de la puissance des tests statistiques et en tenant compte des variabilités connues sur les paramètres étudiés.

Pour limiter le nombre de souris gestantes, tous les individus de la portée qu'ils soient mutés ou non mutés seront utilisés pour les analyses, les animaux non mutés servant de contrôles. De plus, nous combinerons plusieurs types de marquages histologiques sur les mêmes individus. Nous préleverons et archiverons un maximum de tissus à partir d'un même individu, et ce, en prévision de futures expériences.

Pour raffiner les conditions d'utilisation des animaux, les souris gestantes sont élevées dans un environnement enrichi. Préalablement à l'injection, les souris gestantes seront habituées à une contention manuelle. L'injection sera effectuée en respectant la stérilité et les volumes autorisés. Une surveillance journalière des souris gestantes sera effectuée pour vérifier le comportement, l'absence de souffrance, d'hémorragie ou d'infections.

13908 Les glioblastomes sont les tumeurs du cerveau les plus agressives, cependant aucun traitement efficace n'est à ce jour disponible. Plusieurs molécules participent à la résistance au traitement dont des protéines appelées inhibiteurs de l'apoptose. Des molécules entraînant la dégradation des inhibiteurs de l'apoptose sont disponibles dans le commerce et sont appelées les mimétiques de Smac. Nous avons montré dans les glioblastomes que les mimétiques de Smac ont un rôle anti-tumoral sur les cellules tumorales de glioblastomes *in vitro*. De plus, les mimétiques de Smac augmentent la survie des souris et diminuent la croissance tumorale. En plus des cellules tumorales nous savons maintenant que d'autres types cellulaires dont les cellules de l'immunité jouent un rôle clé dans la croissance tumorale et nous avons montré que le traitement aux mimétiques de Smac entraînent une migration des cellules immunitaires périphériques vers le cerveau. Cette étude a pour objectif d'identifier les cellules immunitaires recrutées au site tumoral en effectuant de la cytométrie de masse sous l'effet des mimétiques de Smac et de comprendre leur organisation dans la tumeur et leurs voies d'entrée dans le cerveau en effectuant de la clarification de cerveau qui consiste à rendre les cerveaux transparents pour mieux laisser passer la lumière. Des cellules de glioblastomes d'origine murine seront greffées en intracérébral dans des souris immunocompétentes. Un total de 90 souris sera nécessaire incluant les mises au point sur une durée de 5 ans : 40 souris seront utilisées pour les tests de cytométrie de masse et 50 pour les expériences de clarification de cerveaux. Les animaux seront traités 1 fois par semaine en intraveineux à la dose de 20 mg/kg et le début du traitement commencera une semaine après greffe des cellules tumorales. Pour les expériences de clarification une cinétique sera effectuée et les cerveaux seront récupérés après 15, 21 et 28 jours post greffe. Pour la cytométrie de masse les cerveaux seront récupérés après 21 et 28 jours post-greffe. Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (nestlets, nid végétal et en igloos en polycarbonate) et en groupes de 5 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Les souris seront surveillées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine. Une analgésie pré-opératoire sera effectuée afin d'éviter la douleur. La détection de toute souffrance de l'animal sera assurée et le niveau de souffrance évalué en fonction d'une grille de score et les animaux seront euthanasiés dès l'apparition d'un signe de détresse (perte de plus de 20% du poids, posture, prostration, difficultés à respirer, à se déplacer, ataxie).

13909 Définition du projet et durée :

L'objectif de notre projet de recherche fondamentale, d'une durée de 4 ans, est de montrer qu'il est possible de détecter et de mesurer, à partir d'un scanner spectral à comptage photonique large champ, de manière absolue la concentration de produit de contraste au cours de l'ischémie et au

sein de l'infarctus en utilisant un modèle d'infarctus myocardique chez le porc. Les mesures effectuées seront comparées à celles effectuées sur 2 examens de référence (*in vivo* en IRM 1.5T, et *ex vivo* en histologie).

Mots clés : athérosclérose, infarctus du myocarde, scanner spectral à comptage photonique

Objectifs et attentes du projet :

L'athérosclérose est une des principales causes mondiales de morbi-mortalité, avec un nombre de décès estimé à plus de 17,3 millions par an, soit plus de 30% du nombre total de décès à travers le monde chaque année. L'une des principales manifestations cliniques de la maladie athéromateuse est représentée par l'événement aigu d'infarctus du myocarde, dont on connaît un critère prédictif important, la zone ischémique, qui a déjà fait l'objet d'étude multimodale par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) myocardique, imagerie nucléaire dont la scintigraphie myocardique, et la Tomographie par Emission de Positron (TEP). De plus, les études précliniques et cliniques s'intéressent de plus en plus au post-conditionnement de l'infarctus du myocarde (IDM), comme par exemple avec l'utilisation de molécules anti-inflammatoires, mais aussi d'autres facteurs tels que le temps d'ischémie. En effet, il a été démontré que les lésions de re-perfusion représentent une part significative (20-40%) des lésions irréversibles myocardiques, et qu'il est possible d'en modifier son impact expérimentalement par des processus chimiques ou interventionnels. Ces résultats ont été montrés par une caractérisation myocardique en IRM permettant d'évaluer la zone ischémique pendant et après reperfusion, et la zone infarctée. Cependant, il n'est pas possible de caractériser de manière quantitative ces processus en IRM. Or ceci est très important pour la compréhension « quantitative » des phénomènes physiopathologiques survenant au cours du stress myocardique.

Le scanner spectral à comptage photonique (SPCCT) présente la capacité de quantifier de manière absolue certains atomes à haut numéro atomique, constituants de produits de contraste pour certains déjà utilisés pour l'évaluation de l'infarctus du myocarde. Ainsi, cette capacité pourrait permettre de quantifier les phénomènes physiopathologiques survenant au cours du stress myocardique en analysant et mesurant les concentrations tissulaires en produit de contraste. Les produits de contraste utilisés en pratique courante, présentant une distribution au sein de l'espace extracellulaire, pourront ainsi permettre une évaluation de l'espace extra-cellulaire au cours du stress myocardique. De plus, le scanner spectral peut permettre une caractérisation étalée dans le temps de manière reproductible avec des temps de manipulation courts comme en témoigne la résolution temporelle de l'ordre de la seconde.

Dans l'optique de cette étude, 5 produits de contraste sont candidats à l'imagerie myocardique, représentés par les molécules de gadolinium (1), d'iode (2) et les nanoparticules d'atomes lourds (gadolinium (3), d'or (4) et de bismuth (5)), ces dernières se différenciant par leur taille, concentration absolue en atomes et distribution au sein de l'espace extra-cellulaire. Ces agents de contraste présentent l'intérêt commun d'être de bons candidats à l'imagerie spectrale.

Effets néfastes attendus – degré de sévérité : La procédure est classée sans réveil. Elle se fera sur des animaux profondément anesthésiés et la mise à mort aura lieu en fin d'expérimentation, la procédure ne laisse aucune place à la douleur ou à la souffrance de l'animal.

Règle des 3R et nombre d'animaux :

Dans le souci du respect de la règle des 3R, le modèle animal le plus adapté est représenté par le porc. En effet la taille de cet animal est très intéressante par rapport à la résolution spectrale et spatiale du scanner. De plus, il n'existe pas d'autres modèles substituables d'ischémie-reperfusion myocardique et nous avons l'expérience reproductible de ce modèle d'étude. De nombreuses actions de raffinement seront mise en place comme : une phase d'acclimatation de minimum 4 jours, le passage régulier de l'animalier dans l'enclos, le fait que celui-ci habitue le porc à sa présence, le caresse au niveau du cou, l'utilisation d'une crème de type Lidocaine appliquée au niveau du cou avant l'anesthésie, et pour finir, l'utilisation d'une seringue + prolongateur, permettant l'induction de l'anesthésie à distance (donc avec moins de stress) de l'animal. Enfin, dans le cadre de l'application de la règle des 3R, des laboratoires seront contactés afin de venir prélever du matériel biologique (peau, oreilles, sang, reins) en post mortem.

Nous réaliserons une étude pilote constituée de 1 ou 2 porcs dans le but d'adapter ensuite le nombre de porcs nécessaires afin de bénéficier d'une puissance statistique satisfaisante. La phase expérimentale sera constituée de 18 porcs en incluant 3 porcs en raison de l'échec du modèle estimé à 20%, pour un nombre total maximum de 20 porcs.

13910 La formation des étudiants vétérinaires de 2^{ème} année dans l'Unité d'enseignement de "pharmacie, pharmacologie et toxicologie générales" repose sur un programme réglementaire avec des cours magistraux (CM), des travaux dirigés (TD) et des travaux pratiques (TP).

Dans le cadre de cette demande, seules les séquences pédagogiques utilisant des animaux seront décrites, à savoir :

Séance de TP : Initiation à l'anesthésie injectable utilisant des rats.

Séance de TP : Initiation à l'anesthésie volatile utilisant des rats.

En fin de séance les animaux sont réveillés et seront ré-utilisés pour les autres séances se déroulant les jours suivants. A la fin des séances de TP, nous souhaitons placer les animaux dans des familles d'accueil en particulier auprès des étudiants qui les auront manipulés.

Le nombre d'élèves vétérinaires est près de 150. Sur les huit ateliers d'une séance de travaux pratiques (groupes de 35-40 étudiants), deux seulement font appel aux animaux. 8 rats par séance sont prévus sachant qu'une séance dure 2h et que nous avons jusqu'à 4 séances par jour soit 32 rats au total par an et 160 sur 5 ans.

En matière de remplacement, l'utilisation de méthodes substitutives précède la manipulation des animaux vivants par des manipulations de mannequins BIO-RAT et d'injection dans des peluches.

En matière de réduction, le nombre d'animaux utilisés est restreint et l'organisation en groupe de travail est favorisé (4 ou 5 étudiants). La ré-utilisation des animaux d'un jour à l'autre permet une réelle diminution du nombre total d'animaux utilisés.

En matière de raffinement, les protocoles d'anesthésie-analgésie sont adaptés pour éviter toute douleur ou souffrance aux animaux et aucun animal ne subit d'acte invasif ou de chirurgie.

L'objectif de la formation est d'initier les étudiants à l'anesthésie en appliquant des principes de raffinement dans leur pratique (meilleur choix de protocoles anesthésiques analgésiques, meilleur monitoring et meilleure prise en charge post-opératoire).

13911 L'hypothèse de travail est que l'hétérogénéité tumorale corrèle avec l'agressivité des tumeurs, leur résistance aux traitements et leur capacité métastatique. Cette hétérogénéité est un paramètre biologique complexe qui inclue une hétérogénéité des cellules tumorales et de leur environnement et peut être impactée par les traitements utilisés. Le microenvironnement tumoral crée un sanctuaire pour la mise dans un état de dormance des cellules cancéreuses qui deviennent résistantes aux drogues et sont alors responsables de la récurrence de la maladie plusieurs mois ou année après la rémission. Ce sanctuaire est une zone de tolérance immunitaire renforçant la survie et la croissance des cellules tumorales. Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques et l'analyse de l'impact des traitements sur l'hétérogénéité tumorale et ses conséquences cliniques. Les approches thérapeutiques testées reposeront sur un ciblage des cellules tumorales (ex. chimiothérapie, inhibiteurs de kinases), un ciblage du microenvironnement tumoral (ex. ciblage des macrophages, inhibiteurs de points de contrôle du cycle cellulaire) en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées *in vivo* dans des modèles murins xénogéniques (souris immunodéficientes) ou syngéniques (souris immunocompétentes). Les pathologies tumorales étudiées seront des sarcomes (osseux ou tissus mous) ou de carcinomes (ex. prostate, colon, poumon). Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro*, et les applications cliniques potentielles. Elles sont incontournables avant une application clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*.

Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par condition, à raison de 4

conditions par molécule à tester, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Les expérimentations seront répétées 1 à 2 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés. Un total de 15 molécules sera étudié sur une période de 5 ans.

Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées), et en bithérapie. Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening *in vitro*. Un total d'environ 4000 souris (60% de souris immunodéficientes, 30% de souris immunocompétentes) est prévu sur une période de 5 ans.

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

13912 Les myosites représentent un groupe de maladies auto-immunes rares, se caractérisant par l'apparition d'une atteinte musculaire grave, avec une myodégénérescence associée à un infiltrat cellulaire. Le caractère handicapant de cette pathologie, ainsi que l'inefficacité voire l'effet aggravant de la plupart des traitements immunosuppresseurs, laisse un grand nombre de patients dans une situation difficile, sans prise en charge possible. L'utilisation de thérapies cellulaires dans le traitement des myosites a débuté avec la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, démontrant la faisabilité et l'efficacité de ce traitement, mais au prix d'effets secondaires importants, principalement dus au conditionnement myéloablatif pré-transplantation.

La fraction vasculaire stromale, facilement obtenue par digestion enzymatique d'un lipoaspirat, est un ensemble hétérogène de cellules, principalement composé de cellules souches mésenchymateuses (15-30%), de leucocytes (25-45%), de cellules endothéliales (10-20%) et de péricytes (3-5%). Elle présenterait des propriétés immunomodulatrices et régénératrices, ainsi que pro-angiogéniques, et est aujourd'hui évaluée à travers plus d'une centaine d'essais cliniques dans différentes indications, visant principalement le traitement de blessures graves et de maladies dégénératives, mais aussi dans diverses maladies auto-immunes. Bien qu'aucun essai clinique n'ait été initié dans le traitement des myosites, quelques études pré-cliniques ont montré des capacités myorégénératives dans un modèle lagomorphe d'atteintes musculaires. La greffe de cellules de la fraction vasculaire stromale pourrait donc représenter une nouvelle option de traitement des myosites.

L'objectif principal de ce projet est de démontrer la faisabilité et l'efficacité de la greffe de cellules de fraction vasculaire stromale de tissu adipeux dans le traitement des myosites, et d'améliorer cette efficacité en déterminant le rôle thérapeutique des différentes sous-populations cellulaires qui la composent. Pour cela, nous étudierons les effets de cette thérapie cellulaire et de ses différentes sous-populations sur l'inflammation et la dégénérescence musculaire observés dans différents modèles murins de myosites. Dans l'ensemble des procédures, nous préparons la fraction vasculaire stromale par prélèvement, digestion enzymatique et centrifugation du tissu adipeux inguinal de souris. La fraction vasculaire stromale sera soit directement administrée aux animaux, soit triée afin d'isoler les sous-populations cellulaires avant injection dans le but d'étudier leurs effets individuels. Les cellules seront aussi marquées afin de suivre leur localisation et leur évolution après injection.

Ce projet a été réfléchi et construit avec la volonté de mettre en place et de respecter la règle des 3R.

Remplacer : le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité d'étudier *in vitro* la complexité des interactions cellulaires mises en jeu dans l'efficacité thérapeutique de ce mélange cellulaire, et les réponses immunologiques à l'injection intramusculaire des cellules. Le choix de la souris repose sur la connaissance du système immunitaire de cette espèce, sur la disponibilité d'outils d'analyse des réponses immunitaires et d'évaluation de la force musculaire, et par sa proximité phylogénétique avec l'homme qui permet d'envisager la transposition en clinique de cette thérapie cellulaire.

Le raffinement est permis par l'utilisation de femelles, moins sujettes aux caractères dominants associés à des combats et des blessures, qui seront hébergées tout au long des expérimentations en portoir ventilé, à raison de 4 à 5 animaux par cage. Elles disposeront de nourriture et d'eau à volonté, ainsi que d'un enrichissement du milieu avec du coton (cell-nest) et d'un abri de cellulose. Les animaux seront anesthésiés et analgésiés lors de chaque procédure susceptible d'induire une souffrance et les éventuels points limites anticipés.

Enfin, la réduction est permise par le choix d'effectif de souris basé sur des analyses statistiques optimisées ainsi que sur l'expérience de précédents protocoles analogues menés au laboratoire.

Ce projet requiert l'utilisation d'au maximum 964 souris sur une durée de 3 ans, pour 9 procédures expérimentales avec des degrés de sévérité classés de léger à sévère.

13913 Les affections ostéoarticulaires chroniques sont la première cause de morbidité au monde en touchant environ 20% de la population et tout particulièrement les adultes de plus de 50 ans. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité.

L'arthrite rhumatoïde est une maladie chronique auto-immune caractérisée par des poussées inflammatoires touchant de façon progressive de nouvelles articulations. Ces poussées inflammatoires sont associées à une invasion leucocytaire de la synoviale, à des destructions osseuses et cartilagineuses ainsi qu'à un remodelage articulaire anarchique.

Les traitements des maladies rhumatismales sont basés principalement sur le soulagement de la douleur intense et de l'inflammation. Il n'existe malheureusement à ce jour, aucun traitement permettant de guérir les rhumatismes notamment la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre les rhumatismes chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale.

Notre société étant une CRO qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique, l'objectif de la présente saisine est d'évaluer de nouveaux composés créés et développés par nos clients pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse. Cette procédure est une procédure générique (vu avec la DSV, le CEEA et le MESR pour la soumission de saisines génériques) étant donné que nous ne connaissons pas à l'avance les différents composés qui seront à tester.

Les différents composés développés par nos clients seront testés et comparés à un produit de référence adapté. Les composés seront testés chez le rat ou la souris immunocompétent ou immunodéficient (selon les composés à tester si ces derniers sont d'origine xénogénique ou non), en traitement préventif ou curatif, et appliqués selon les schémas thérapeutiques inhérent aux composés, dans le cadre d'études menées au sein de notre société. Selon notre historique, nous estimons mener 3 études souris et 2 études rats par an, soit 15 études souris et 10 études rats sur 5 ans. Sachant que 110 animaux maximum sont utilisés par étude, nous estimons que 1650 souris et 1100 rats seront utilisées sur 5 ans.

Les molécules seront évaluées sur leur efficacité contre l'inflammation, la résorption osseuse et/ou la dégradation cartilagineuse.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour :

Remplacer : la pathologie rhumatismale étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pouvant reproduire cette complexité. Toutefois, nous demandons à nos clients de tester les principes actifs au préalable afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs.

Réduire : pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisé est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessairement réaliser une deuxième étude.

Raffiner : nous mettrons en place des mesures spécifiques et adaptées aux douleurs occasionnées par les rhumatismes pour éviter toute souffrance inutile et prolongée : les conditions d'hébergement

seront optimisées (litière spécifique, augmentation de l'enrichissement, facilité d'accès à l'alimentation et ajout de nourriture appétente), nous utiliserons un anesthésique lors de l'induction de la pathologie, des traitements antalgiques pré et post induction et dès l'apparition des premiers signes inflammatoires. Un suivi quotidien des animaux sur des caractéristiques spécifiques (gonflement, locomotion et sensibilité mécanique) sera effectué. Tout animal ayant atteint un ou plusieurs des points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien et en s'appuyant sur des grilles de bien-être animal adaptées) sera euthanasié.

Nous maintiendrons les animaux le minimum de temps dans une situation d'inconfort et de douleur (lors du traitement expérimental et lors des prises de mesures). Dans la mesure du possible, la prise de mesures sera effectuée dès l'apparition de la première phase de douleur aiguë de manière quotidienne et seulement deux fois par semaine dans les phases de douleurs chroniques.

13914 L'allergie alimentaire est devenue un sujet de première importance dans le domaine de la sécurité alimentaire, illustré notamment par l'augmentation importante du nombre d'articles publiés chaque année sur les thèmes « science des aliments » et « nutrition humaine ». Elle peut être définie comme une réaction anormale de défense du corps à la suite de l'ingestion ou à l'exposition à un aliment. Elle est en augmentation et touche 4% des adultes et 8% des enfants dégradant de façon importante la qualité de vie de ces patients et entraînant des risques parfois très graves. Ceci représente un fardeau économique considérable sur les familles et la société. Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif et seul un régime d'éviction est recommandé.

L'allergie se caractérise par une rupture de la tolérance qui se traduit par une diminution de la réponse T régulatrice (Treg) capable d'empêcher une réaction immunitaire incontrôlée. Ce projet a pour objectif de développer une nouvelle stratégie thérapeutique dans l'allergie alimentaire en traitant durablement les patients allergiques grâce à un complexe protéique particulier pour rétablir leur tolérance. Des résultats obtenus précédemment ont pu démontrer l'efficacité de ce complexe et nous poussent à continuer nos investigations ayant pour objectifs de réaliser tout d'abord une étude de pharmacocinétique permettant de décrire le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant, puis une étude toxicologique afin de définir les doses toxiques du candidat médicament pour un organisme vivant mais aussi l'absence d'effet toxique comme l'hyperperméabilité pulmonaire (risque majeur des traitements à base d'IL-2 par augmentation de la perméabilité pulmonaire induisant une entrée d'eau et un risque d'œdème) et enfin une étude phénotypique visant à définir quelles sont les populations cellulaires effectrices et régulatrices augmentées par le complexe IL-2.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 136 souris femelles Balb/c.

Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire, remplacer ou raffiner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est en effet impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes *in vitro* ou *in silico*. Ces travaux constituent des éléments essentiels pour entamer une étude clinique chez l'homme en toute sécurité. Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique et a été réduit au maximum. Les animaux seront logés dans un environnement adapté avec une humidité relative et une température contrôlée et bénéficieront d'enrichissements. Enfin, le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec évaluation quotidienne des signes généraux. Lors des procédures expérimentales, une observation quotidienne et un suivi minutieux des points limites permet de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en terme de "bien-être" animal.

13915 Ce projet consiste en une étude comparative des bases comportementales et cérébrales du traitement des vocalisations conspécifiques (voix) chez 3 espèces de primates : l'humain, le macaque rhesus et le marmouset commun. Ces trois espèces ont en effet une communication vocale riche et des résultats récents mais fragmentaires suggèrent la présence de « patches vocaux » dans leur cerveau: des régions corticales montrant une activité particulièrement élevée en réponse à la voix d'un individu de la même espèce.

Le projet a pour but: (1) de comparer les trois espèces au moyen de tests comportementaux similaires via des systèmes de tests automatisés accessibles à volonté par les singes ; (2) d'utiliser pour comparer les réponses cérébrales à la voix l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), une technique de neuroimagerie non-invasive pouvant être utilisée de manière comparable chez les trois espèces. Nous testerons en particulier l'hypothèse de l'existence d'un système de patchs vocaux, fortement conservé chez les primates comme c'est le cas pour les « patchs de visages » du cortex visuel, et dont nous examinerons en détail les similarités et différences entre espèces. Nous espérons que les résultats obtenus fourniront des informations précieuses sur l'évolution récente de la perception de la voix chez les primates et son rôle potentiel dans l'émergence de la parole et du langage humains.

La partie du projet présentée ici concerne les expériences réalisées chez le singe rhésus. Les expériences seront effectuées sur un groupe de 12 jeunes adultes (11 femelles, 1 mâle) hébergés ensemble dans une grande volière enrichie, permettant des interactions sociales complexes. Ils seront soumis à des tests de perception de la voix via des systèmes de test automatiques accessibles à volonté depuis leur volière et leur délivrant des petites récompenses alimentaires. Pour l'IRMf, les sujets seront implantés chirurgicalement avec un plot de tête, avec analgésie pendant la chirurgie et la phase de récupération suivante, placée sous suivi vétérinaire. Une fois la récupération effectuée, ils seront entraînés à rester immobile dans leur chaise dans un faux scanner, en sessions de travail quotidiennes constituées d'étapes d'habituation progressives afin de minimiser le stress de l'animal. Pour l'imagerie proprement dite les individus seront transportés et hébergés par paires dans un espace de stabulation temporaire proche du scanner, pour des campagnes d'imagerie quotidienne de deux semaines, puis retournés à leur groupe.

3Rs

Remplacement. Il s'agit d'une étude comparative entre l'humain et d'autres espèces. Il est donc inévitable pour ce projet d'avoir recours aux animaux. Nous examinons différentes espèces de primates afin de reconstituer l'évolution relativement récente (< 35 millions d'années) de la perception de la voix.

Réduction. Il est prévu d'étudier un groupe de 12 singes rhésus. Ils seront logés ensemble dans une grande volière (~50 m²) permettant des interactions sociales riches favorisant le bien être du groupe et une meilleure survie des nouveaux nés. Cette taille de groupe permettra d'accumuler un grand nombre d'essais aux tests comportementaux. Il rend aussi possible une comparaison aux données IRM fonctionnelle humaines sur la base de groupes de sujets de taille comparable. Il s'agit d'un aspect crucial de cette étude comparative, essentiel pour obtenir une évaluation de la variabilité interindividuelle à travers les espèces, notamment celle de la latéralisation cérébrale des patchs vocaux.

Raffinement. Les procédures envisagées sont de classe légère à modérée, notamment de par l'accès volontaire aux tests comportementaux, et de par l'utilisation d'une technique d'imagerie peu invasive, après entraînement intensif dans un faux scanner afin de diminuer le stress de l'animal. La pose du plot de tête s'effectuera sous anesthésie et analgésie après prémédication afin d'éviter au maximum tout stress ou douleur pour le sujet.

13916 La maladie de Parkinson (MP) est une atteinte neurologique chronique dopaminergique, qui induit notamment d'importants troubles moteurs. Deuxième pathologie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer, la MP touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Les thérapeutiques actuelles permettent d'atténuer les symptômes, mais aucune d'entre elles ne ralentit le développement de la pathologie. La protéine α -syn, sous sa forme toxique, joue un rôle clef dans le développement de la MP. Aujourd'hui, il n'existe pas de modèle animal reflétant la mise en place de la MP, permettant de déterminer les mécanismes impliqués dans cette dernière et de tester efficacement de nouvelles thérapies. C'est pourquoi, nous avons entrepris le développement d'un modèle animal chronique innovant, basé sur l'administration quotidienne, par voie intranasale qui est indolore et non invasive, de la forme toxique de la protéine α -syn, susceptible de mimer la progression de la MP chez l'Homme. Chez l'Homme, seule la récupération fonctionnelle des troubles moteurs, grâce aux médicaments antiparkinsoniens (LDopa, qui palie la perte de

dopamine), permet de confirmer le diagnostic de la MP. Le premier volet de notre projet actuel, a donc pour but de confirmer que notre modèle animal murin est sans conteste un modèle animal parkinsonien en évaluant la réponse locomotrice des animaux après administration de médicaments antiparkinsoniens. Par ailleurs, au moment du diagnostic de la MP chez les patients, 50 à 70% des neurones dopaminergiques ont déjà dégénéré. Il est donc nécessaire d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes intervenants dans la mise en place et la progression de la MP pour tenter d'obtenir un diagnostic plus précoce. Notre second objectif est donc de déterminer grâce à notre modèle le potentiel de nouvelles approches d'imagerie non invasive, en tant qu'outil diagnostique précoce de la MP. Enfin de nombreuses études soulignent le caractère neuroprotecteur de la lumière selon sa longueur d'onde dans le cadre de la MP. Notre troisième objectif est de déterminer les potentiels mécanismes de neuroprotection induits par cette lumière ainsi que son efficacité au cours de la progression de la maladie, afin d'optimiser le traitement des patients atteints de la MP.

L'étude se fera en comparant des animaux contrôles à des animaux exposés à l' α -syn, qui seront ou non exposés à une illumination et nécessitera l'utilisation de 60 souris.

Nous mènerons nos études dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Il n'existe pas de modèle non biologique ou *in vitro* permettant de réaliser ces travaux sans perte d'informations scientifiques.

Réduire : afin de limiter le nombre de lots expérimentaux et compte tenu que les expériences ne sont pas de classe sévère, des cohortes d'animaux pourront être utilisées pour répondre à plusieurs objectifs. De plus, le nombre d'animaux pourra être réduit jusqu'à 50% dans certaines procédures si l'effet attendu est suffisamment important pour obtenir des résultats statistiquement fiables avec la première moitié d'animaux ou si les données se révèlent non pertinentes (arrêt alors des expérimentations).

Raffiner : Les souris seront hébergées à l'animalerie en groupe sociaux, dans un environnement enrichi adapté à leur espèce. De plus, toutes les procédures réalisées sur les animaux vigiles (administration de l' α -syn, illumination et tests comportementaux) sont indolores et elles seront effectuées par des personnes expérimentées et formées. Les séances d'imagerie des animaux se feront sous anesthésie générale gazeuse, ils seront placés sur un tapis chauffant pour maintenir leur température et un gel ophtalmique sera appliqué afin de limiter leur inconfort. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et tout sera mis en oeuvre afin que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible. En cas d'effets inattendus, de perte importante de poids ou d'observation d'un phénomène douloureux, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera immédiatement alerté afin de mettre en oeuvre des traitements appropriés ou de décider de l'interruption de l'expérimentation.

13917 La parvovirose est une maladie virale du canard de barbarie à transmission horizontale provoquant mortalité, retard de croissance, déplumement ainsi que des troubles locomoteurs et respiratoires importants. La maladie touche les canetons jusqu'à 5 semaines d'âge. La prévention de cette maladie repose sur une vaccination des reproducteurs et des canetons.

La maladie de Derzy touche l'oie et le canard, elle est due à un autre parvovirus. Elle touche les canetons (et oisons). Elle entraîne des retards de croissance importants donnant le syndrome "nanisme bec court". La prévention repose sur une vaccination des reproducteurs et des canetons.

Les productions des vaccins actuels contre ces deux maladies reposent sur l'utilisation d'animaux. Des élevages de canes EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) servent à la production d'oeufs sans anticorps qui permettent la multiplication du virus. Ce type de production occasionne de nombreuses ruptures de disponibilité de ces vaccins.

L'objectif de ce projet est le développement d'un vaccin bivalent (parvovirose + maladie de Derzy) avec multiplication des virus sur cellules en laboratoire (pas d'utilisation d'animaux lors de la production des lots du vaccin).

La maladie de Derzy est présente en France depuis les années 1970. La parvovirose du canard depuis les années 1990. Ces virus étant très résistants, ces maladies circulent en permanence sur le territoire.

Un vaccin produit par multiplication des virus sur cellule permettra d'assurer la disponibilité permanente d'une prévention de ces maladies des canards.

Les essais prévus sur animaux sont ceux uniquement réalisables sur animaux, le test permettant de vérifier l'inactivation du principe actif viral du vaccin est réalisé sur des cultures cellulaires, ce qui permet d'éviter l'utilisation d'animaux.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque essai est celui exigé par la pharmacopée européenne. Pour les essais mis en place pour obtenir des informations scientifiques, le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats significatifs.

Les surfaces d'hébergement sont en accord avec la directive 2010 63 UE.

Les conditions d'hébergement sont vérifiées quotidiennement (éclairage, température, hygrométrie, nourriture, abreuvement).

Une procédure d'évaluation des points limites des animaux est mise en place. Cela permet d'évaluer toute douleur physique ou psychique sévère, souffrance ou état moribond. La procédure permet, le cas échéant, un arrêt du protocole, sa modification, l'administration d'un traitement symptomatique, voire l'euthanasie de l'animal.

L'état des animaux est vérifié quotidiennement par une personne compétente, et le vétérinaire responsable est consulté afin de prendre d'éventuelles mesures nécessaires.

Ces essais seront réalisés sur le canard de barbarie, il s'agit de l'espèce cible du vaccin, sensible aux deux parvovirus, permettant d'apporter les informations les plus pertinentes.

Un maximum de 1170 animaux utilisés est prévu pour le développement.

13918 Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des problèmes de reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie, apparue en Europe de l'Ouest au début des années 90, est très présente dans les régions à forte densité de production porcine (plus de 60% des élevages infectés en Bretagne). Cette infection conduit à des pertes économiques considérables ainsi qu'à une utilisation importante d'antibiotiques en élevage en raison des complications bactériennes secondaires.

Parmi les mesures de lutte contre le virus du SDRP (SDRPV), la vaccination est une des plus souvent mises en œuvre sur le terrain. Les vaccins les plus utilisés sont les vaccins vivants atténués (en anglais modified live vaccine : MLV) qui ont démontré leur efficacité clinique tant vis-à-vis des problèmes de reproduction que des troubles respiratoires induits par le SDRPV. Nous avons par ailleurs montré que ces vaccins étaient également capables de diminuer très significativement la transmission inter-porc du virus en condition expérimentale chez des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) et d'anticorps d'origine maternelle (AOM) spécifique du SDRPV. Sur le terrain, la difficulté à contrôler la transmission virale à l'aide de ces mêmes vaccins MLV suggère que certains facteurs pourraient diminuer l'efficacité théorique mise en évidence en conditions expérimentales. Nous avons ainsi récemment montré que les AOM pouvaient diminuer la réponse immunitaire et l'efficacité vaccinale lors d'une vaccination SDRP à l'aide d'un vaccin MLV non-macrophage tropic (ou nMT), c'est-à-dire qui ne réplique pas dans les macrophages pulmonaires, principales cellules cibles des virus SDRP « sauvages ». Comme déjà montré dans d'autres espèces (volailles notamment), un vaccin MLV macrophage-tropic (ou MT) qui lui se réplique dans les macrophages pourrait être en mesure de contrecarrer cette interférence avec les AOM.

Dans ce contexte, l'objectif du présent projet est d'étudier de manière comparative, chez le porcelet, la réponse immunitaire et l'efficacité vaccinale lors de l'administration d'un vaccin vivant SDRP qui réplique ou non dans les macrophages (MT-MLV ou nMT-MLV), ceci chez des animaux porteurs ou non d'AOM spécifiques de ces souches vaccinales SDRP.

Le projet reposera sur 2 procédures nécessitant un total de 63 animaux. La première procédure (nécessitant 7 truies) visera à faire naître des porcelets avec ou sans AOM vis-à-vis de chacun des vaccins MT-MLV et nMT-MLV. Pour ce faire, 2 truies seront vaccinées en cours de gestation avec un vaccin MT-MLV, 2 autres le seront avec un nMT-MLV, et 3 truies resteront non vaccinées.

La seconde procédure inclura 7 groupes de 8 porcelets chacun (total 56 porcelets), issus des mises-bas des truies de la procédure 1. Pour chaque vaccin (MT-MLV et nMT-MLV), des groupes de 8 porcelets, issus de truies vaccinées ou non, seront eux-mêmes vaccinés ou non. Les animaux seront challengés avec une souche virulente de SDRP 6 semaines après vaccination. Un groupe contrôle non vacciné, non challengé sera également inclus dans le dispositif.

Etant donné que l'infection par le virus du SDRP est spécifique aux suidés, il n'y a pas de possibilité de remplacement du modèle porc pour cette étude. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe, bénéficieront d'un enrichissement social et auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

Les connaissances générées dans le cadre de ce projet permettront d'optimiser les protocoles de vaccination contre le SDRP sur le terrain et ainsi d'obtenir un contrôle plus rapide et plus efficace de cette infection en élevage par les vaccins.

13919 Aujourd'hui, il est crucial de comprendre l'impact d'événements climatiques extrêmes (sécheresse par exemple) sur la faune sauvage. Par exemple, lors de la période estivale, les petits vertébrés, et notamment les oiseaux communs sont très souvent confrontés à des périodes lors desquelles l'eau de boisson est très difficile à trouver. Ainsi, nous proposons d'étudier l'effet d'une privation temporaire d'eau de boisson sur le comportement et la physiologie d'une espèce d'oiseau commun, le moineau domestique (*Passer domesticus*).

Pour ce faire, 2 lots expérimentaux (15 individus pour chaque lot) seront soumis respectivement à une privation d'eau de boisson de courte durée (6h) ou à un accès ad libitum à l'eau de boisson. L'accès à l'eau sera rétabli suite à cette courte période. Cette durée de privation d'eau a été choisie en accord avec des études précédentes qui ont soulignées l'absence d'effet délétère à long-terme de cette privation. Cette durée a donc été choisie pour réduire au minimum l'inconfort provoqué par ce traitement expérimental. Nous notons toutefois que cette durée correspond à ce qui est rencontré dans la nature par cette espèce, notamment pendant les chaudes journées d'été.

Suite à cette privation, nous effectuerons deux prélèvements sanguins pour comprendre l'impact physiologique de cette privation, notamment les mécanismes hormonaux sollicités lors d'une courte déshydratation et les réponses comportementales associées pendant la déshydratation et la phase de réhydratation (niveaux d'activité, prise alimentaire, variation pondérale, rythme de défécation).

Cette expérimentation prend en compte la règle des 3R : le remplacement n'est pas envisageable car l'expérimentation cible une espèce largement distribuée géographiquement et donc soumise naturellement à des sécheresses occasionnelles. La réduction a été prise en compte en limitant le nombre d'animaux employés (30 individus). Enfin, le raffinement comprendra le maintien des animaux dans des conditions de captivité optimales, notamment dans des cages individuelles enrichies (perchoirs, épis de millet, miroirs).

13920 La production mondiale de plastiques a considérablement augmenté au fil des décennies et est devenue un enjeu environnemental et sociétal par la pollution engendrée. La population humaine est exposée aux microparticules de plastique (MPL) par son environnement et/ou au travers de son alimentation. La grossesse est un état physiologique qui est peu pris en compte dans les études de toxicologie et très peu de données existent sur l'évaluation des effets de l'ingestion des MPL au cours de la gestation sur la mère et sa descendance.

Le placenta, situé à l'interface entre la mère et le fœtus, exerce des fonctions immunitaires, endocrines et d'échanges qui influencent le métabolisme fœtal, placentaire et maternel et donc le développement de l'unité fœto-placentaire. Du fait de sa situation spatiale, comme barrière, et

temporelle, pendant une période clé du développement, cet organe est particulièrement sensible aux conditions environnementales maternelles et représente un acteur crucial de la programmation fœtale et métabolique. Actuellement, seul le passage de particules de polystyrène a été évalué dans cet organe, via différentes approches. En définitive, l'état de l'art souligne l'absence de données sur les effets d'une contamination maternelle quotidienne par des micro(nano)particules de plastiques sur le développement fœtal, la fonction placentaire et leur biodistribution à la fois chez l'Homme et dans des modèles animaux ou cellulaires.

Ce projet a pour objectif d'évaluer les conséquences de l'exposition maternelle chronique aux MPL par ingestion, avant et pendant la gestation, sur le développement fœto-placentaire.

Ce programme permettra d'établir i/ la distribution des MPL dans l'organisme maternel et fœtal et le tissu placentaire ii/ si l'exposition à ces MPL affecte le développement placentaire et foetal.

Pour ce projet, le recours à l'animal est indispensable ou irremplaçable car la collecte des placentas et des organes fœtaux est nécessaire. Ce projet prévoit le recours à 160 souris et de 600 foetus, soit un total de 760 animaux répartis de la façon suivante :

- 60 souris destinées à la formation du personnel impliqué dans ce projet
- 100 souris réparties en 5 lots de 20 souris afin d'obtenir 12 souris gestantes par lot. Deux lots de souris (MPL fluorescentes et contrôle) seront utilisés pour les études de biodistribution par imagerie, tandis que les 3 autres lots (deux doses de MPL et contrôle) seront utilisés pour les analyses biométriques et fonctionnelles. Il est attendu un maximum de 10 foetus par souris gestante, soit 120 foetus par lot, et un total de $5 \times 120 = 600$ foetus.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour permettre d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'exploitation des résultats. Tous les animaux utilisés sont spécialement élevés à des fins d'expérimentation. Il s'agit de souris de souche C57Bl/6J utilisées pour les études biomédicales en raison de la similarité entre le placenta humain et celui de la souris.

Les procédures expérimentales utilisées incluent :

- une phase d'habituation des animaux à la manipulation et au gavage en vue de l'exposition aux MPL, ceci afin d'éviter un stress éventuel au cours de l'expérimentation animale. Si des animaux présentaient des signes de stress au cours de la phase d'habituation, ils seraient exclus du protocole et retourneraient dans l'élevage
- l'exposition quotidienne des femelles aux MPL (avant et pendant la gestation, soit 60 jours d'exposition))
- une évaluation quotidienne de l'état de santé des animaux sera appréhendée en définissant un score via une grille d'évaluation de la douleur. Si un score trop élevé était atteint, l'animal serait retiré du protocole expérimental.
- l'euthanasie des animaux pour prélèvements de tissus et fluides.

Ce projet est en conformité avec les exigences des 3R car i/ il porte sur la gestation et qu'il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique (Remplacement) ii/ lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables (Réduction) iii/ l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent. De plus, les animaux bénéficieront de conditions d'hébergement avec enrichissement comme des tunnels ou igloos (Raffinement).

13921 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité chez les personnes âgées en occident. Il en existe deux formes : atrophique et exsudative (qui peuvent coexister). La forme exsudative correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux choroïdiens pouvant provoquer des hémorragies et par conséquent la cécité. Les traitements actuels (anti-VEGF, empêchant la formation de ces nouveaux vaisseaux) sont uniquement suspensifs et il n'existe pas de traitement curatif. Afin de trouver de nouvelles thérapeutiques, il est indispensable de comprendre les mécanismes de la DMLA en général, et de la forme exsudative en particulier.

Cette maladie, résultat de l'interaction complexe entre différents types cellulaires, ne peut être modélisée *in vitro*, d'où l'intérêt des modèles animaux. Le syndrome d'apnée du sommeil (SAS) est une pathologie fréquente se caractérisant par la récurrence d'apnées durant le sommeil, induisant une hypoxie intermittente chronique (HIC). La forme la plus fréquente est le SAS obstructif, le plus souvent associé à une obésité. En raison de la prévalence de l'obésité en occident, l'incidence de cette pathologie est amenée à croître. L'HIC au cours du SAS a été associée avec une néovascularisation (NV) anormale et avec la DMLA réfractaire aux anti-VEGF. Nous pensons donc que le SAS pourrait aggraver l'apparition de néovaisseaux choroïdiens (NVC) et modifier leur réponse aux anti-VEGF.

L'apparition de NVC peut être expérimentalement induite par photocoagulation par laser surdosé. La photocoagulation laser chez le rongeur est le modèle le plus utilisé pour « mimer » la DMLA exsudative. Afin d'étudier les mécanismes en amont et en aval de la NVC, nous soumettons nos modèles animaux à des impacts laser sous anesthésie générale afin de déclencher la NVC. D'un autre côté, pour mimer le SAS chaque animal sera placé dans une cage permettant de moduler les taux d'oxygène : les animaux seront soit placés dans des cages permettant de délivrer un taux constant en oxygène pouvant atteindre 10%, ou dans des cages permettant de réaliser de courts épisodes d'hypoxie en abaissant le taux d'oxygène à 5% sur 30 secondes, suivies de 30 secondes de normoxie (21% d'oxygène), pendant 8 heures par jour, ce qui correspond au modèle habituellement utilisé pour mimer le SAS. Les souris seront ensuite euthanasiées à différents temps pour analyses. Nous analyserons l'implication des différents acteurs cellulaires, leurs médiateurs chimiques en contexte hypoxique ainsi que l'effet de cette hypoxie sur la réponse aux anti-VEGF, et, une fois le mécanisme résolu, les animaux seront traités avec des inhibiteurs spécifiques issus des résultats de ces étapes pour développer de nouvelles thérapies.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet ; comme expliqué plus haut, la DMLA est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires et ne peut être complètement modélisée par des modèles cellulaires *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Ils bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale. Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être. Un total de 1410 souris sera nécessaire.

13922 Ce projet a pour but d'apporter de nouvelles connaissances concernant la formation des cellules reproductrices femelles et leur capacité à produire un embryon après fécondation. Notre intérêt est fondamental mais nos résultats pourraient permettre de mieux comprendre certaines stérilités chez la femme.

Nous nous intéressons au complexe de protéines qui est nécessaire pour initier l'expression des gènes dans les cellules. Nous avons montré que la mutation d'un gène codant pour l'une de ces unités, spécifiquement dans les ovocytes chez la souris, n'a pas d'effet sur la production d'ovules, en revanche, ces femelles mutantes ne semblent pas capables de produire des portées, suggérant un problème lors du début du développement embryonnaire, au moment où l'expression des gènes de l'embryon débute.

Nous voulons étudier les premiers jours de développement embryonnaire, en croisant des souris femelles portant la mutation avec des mâles normaux ou portant aussi la mutation, et en analysant les embryons produits depuis la fécondation jusqu'à 3 jours de développement, juste avant l'implantation dans l'utérus. L'objet de cette saisine est la stimulation de la production d'ovules chez ces femelles par traitement hormonal. Un maximum de 72 souris sont nécessaires pour le projet.

- remplacement: à ce jour, il n'y a pas de système cellulaire qui permette de modéliser la fécondation et les premiers stades de développement de l'œuf fécondé.

- réduction: l'objet de la saisine a pour but d'obtenir plus d'œufs fécondés par femelles, en stimulant par traitement hormonal, la production d'ovules. En général, une femelle souris produit 8 ovules par cycle, le traitement hormonal permet d'obtenir jusqu'à une trentaine d'ovules, autrement une réduction d'un facteur 4 du nombre de femelles nécessaires pour obtenir un nombre comparable d'embryons.

- raffinement: la stimulation par traitement hormonal consiste en deux injections intrapéritonéales. Cette procédure n'est pas douloureuse et est limitée dans le temps puisque les embryons sont récupérés au plus tard 6 jours après la première injection. Cette procédure ne nécessite pas d'isoler les femelles et permet de maintenir des conditions d'élevage normales en maintenant les liens sociaux entre les animaux.

13923 Parmi les maladies héréditaires, nous nous intéressons à une maladie métabolique rare responsable de violentes douleurs abdominales et pouvant se compliquer de troubles neurologiques graves (convulsion, paralysie...) : la porphyrie. Cette maladie est due à une anomalie d'une enzyme (déficitaire à 50%) avec pour conséquence l'accumulation de métabolites neurotoxiques (responsables d'atteintes du système nerveux) lorsque le patient est soumis à un facteur déclenchant (certains médicaments, stress, infection, cycle menstruel...). Actuellement, un seul traitement efficace est disponible, il est injectable et présente plusieurs effets secondaires. Nous souhaitons développer un nouveau traitement présentant moins d'effets secondaires, qui soit efficace, si possible, par voie orale et en traitement préventif.

Les molécules thérapeutiques ont d'abord été sélectionnées *in vitro*, sur leur effet direct sur l'enzyme en cause (en augmentant la demi-vie de l'enzyme, donc sa quantité dans les cellules). Les molécules candidates ont ensuite été testées sur une lignée cellulaire humaine pour valider leur efficacité mais également pour évaluer leur toxicité.

Les molécules thérapeutiques retenues seront administrées au modèle murin atteint de cette maladie métabolique par voie orale ou par voie intrapéritonéale (injection dans la membrane enveloppant la cavité abdominale). Ce modèle de souris génétiquement modifié reproduit biologiquement l'accumulation des métabolites. Pour induire la maladie chez les souris, nous administrons un médicament (sédatif utilisé en médecine humaine) par voie intrapéritonéale. Cliniquement, la souris ne présente pas les signes aigus comme chez l'homme.

Pour évaluer l'efficacité des molécules thérapeutiques en traitement préventif, nous comparerons sur les mêmes animaux les marqueurs biologiques de la crise. Pour chaque animal, la crise sera d'abord induite sans traitement préventif puis la crise sera ensuite déclenchée chez le même animal sous traitement préventif. De cette façon chaque souris est son propre contrôle.

Il sera administré un médicament inducteur pendant 3 jours successifs à des souris vigiles (âgées de 2 à 6 mois). Après au minimum 1 semaine de « mise au repos », pendant laquelle aucun traitement ne sera administré, les mêmes souris recevront quotidiennement pendant maximum 12 jours, par voie orale, la molécule thérapeutique. Les 3 derniers jours du traitement, la crise sera induite par administration intrapéritonéale de médicament inducteur (sur animal vigile). Si aucun effet de la molécule thérapeutique n'est observé par voie orale, nous réaliserons alors une autre série de traitement sur d'autres animaux en administrant la molécule thérapeutique par voie intrapéritonéale (sur animal vigile) afin de déterminer si la molécule est efficace par voie injectable. Les souris seront euthanasiées le dernier jour du traitement et leur foie sera prélevé.

Des prélèvements d'urine et de sang au niveau de la queue seront réalisés à différents temps sur animaux vigiles. Le rythme de prélèvement sera de 3 jours de suite puis de nouveau 3 jours de suite après une période de minimum 7 jours de mise au repos de tout traitement.

Ce projet nécessite un total de 360 souris et sera mené sur une durée de 5 ans. La démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R :

1- Remplacement : les mécanismes étudiés reposent sur des interactions entre organes au sein d'un système intégré, impliquant de recourir à l'animal. En effet, l'accumulation de métabolites est localisée au niveau du foie, ils sont ensuite déversés dans le sang et excrétés au niveau des urines.

Les métabolites sont mesurés dans le sang et les urines, ce qui nous permet d'évaluer le niveau de la crise.

2- Réduction : toutes les expérimentations réalisées utiliseront le nombre d'animaux minimum de façon à tirer des conclusions statistiquement fiables. Les groupes seront comparés par des tests non paramétriques. Un effectif de 6 ou de 10 souris par groupe a été estimé nécessaire afin d'obtenir suffisamment de puissance dans ce type de comparaison. Pour diminuer le nombre d'animaux génétiquement modifiés à produire, nous traiterons aussi bien des souris mâles que femelles.

Seules les molécules thérapeutiques qui ont montré un effet sur le modèle cellulaire et une absence de toxicité seront administrées à la souris.

3- Le raffinement : réduire l'inconfort et la douleur des souris. Les souris seront surveillées quotidiennement. Les signes du comportement et l'apparence physique seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification afin de favoriser leur bien-être.

13924 Le bleu de méthylène le plus récent sur le marché, est un composé proposé dans le cas de méthémoglobinémie. Il est commercialisé sous la forme d'une solution injectable. Les travaux réalisés par notre unité ont permis de montrer l'efficacité du bleu de méthylène dans un modèle de paludisme murin simple ou sévère (neuropaludisme). L'objectif du projet est d'estimer la capacité de protection de cette molécule même avec un traitement intermittent contre les formes graves et simples du paludisme dans un modèle murin. Cet essai est une preuve de concept afin de fournir des données dans le cadre d'un éventuel traitement pour les personnes à risques vis-à-vis du paludisme (enfants, femmes enceintes).

La contrainte de résistances aux antipaludiques, nous impose d'associer le bleu de méthylène avec des antipaludiques reconnus et pour lesquels la résistance n'est pas actuellement caractérisée. Cela permet d'agir sur deux mécanismes supposés indépendants et différents l'un de l'autre.

Une procédure expérimentale est prévue afin de mener à bien ce projet, en prenant en compte la règle des 3R:

1) comparer l'efficacité du BM seul ou en association avec le traitement de référence pour les populations à risque (dihydroartémisinine+pipéraquine) avec deux durée de traitements différents

L'efficacité d'un médicament sur un agent infectieux nécessite par définition, un organisme vivant et entier. Cela est d'autant plus pertinent afin d'observer la protection conférée par le traitement vis-à-vis de cet agent infectieux dont les atteintes sont multi-viscérales. En accord avec le principe de réduction des effectifs, les effectifs de souris seront calculés par rapport aux lois statistiques de survie dans ce modèle. Les organes tissus seront prélevés après la mort afin de réaliser des études complémentaires. La récupération des échantillons biologiques permet également de limiter les expériences complémentaires ultérieures avec de nouveaux animaux vivants. Le remplacement par une méthode alternative n'est pas viable et les études *in vitro* ont déjà été menées au préalable avec des résultats concluants. Le choix du modèle murin C57BL6 repose sur notre maîtrise complète du modèle, en tant que rongeur infecté ou non et des outils nécessaires à son évaluation. C'est un modèle largement utilisé en pharmacothérapie antipaludique. Le nombre de souris a été évalué à 50 femelles matures pour l'expérience.

Quant aux dommages escomptés ils se placent au niveau du modèle et des expérimentations, il faudra infecter des animaux avec une souche létale.

En Afrique et l'état sauvage, le parasite *Plasmodium berghei* infecte des petits rongeurs grâce son vecteur local. En raison de sa capacité à infecter les rongeurs *P. berghei* est un organisme modèle populaire pour l'étude du paludisme humain.

L'administration du bleu de méthylène entraînera un bleuissement des souris. En accord avec le principe de raffinement, les éventuels signes de souffrance seront systématiquement recherchés et évalués. Une attention particulière sera portée à l'enrichissement des rongeurs, de manière à limiter

l'anxiété des animaux. Des abris, des morceaux de cartons et des éléments à ronger seront placés dans les cages et les souris seront habituées à la manipulation

13925 Les mécanismes générant une sensation de faim ou de rassasiement sont complexes. Ils font intervenir des hormones sécrétées par l'estomac et l'intestin, agissant sur plusieurs organes dont le cerveau.

La régulation de l'appétit participe à plusieurs caractères d'intérêt : efficacité alimentaire, vitesse d'engraissement, fertilité, régulation thermique, etc. Deux lignées divergentes de porcs, sélectionnées à partir d'une même population, diffèrent sur un critère d'efficacité alimentaire (capacité à produire plus ou moins de muscle à partir d'une même ration alimentaire) : une lignée étant très efficace, l'autre peu efficace. Pour mieux comprendre les mécanismes biologiques régulant la satiété, nous souhaitons (i) comparer l'expression des gènes dans l'intestin de ces deux lignées, et (ii) comparer l'impact de la prise d'un repas sur le niveau d'expression des gènes dans ces deux lignées, tout en prenant en considération le bien-être animal via les 3 R : Remplacer, Réduire, Raffiner. Nous étudierons aussi un facteur participant à la régulation des gènes : la méthylation de l'ADN. Pour ce faire, en l'absence de modèle *ex vivo* approprié (impossibilité de Remplacer complètement l'utilisation d'animaux), nous allons mesurer le niveau d'expression des gènes dans l'intestin de porcs de 9 semaines issus de ces deux lignées divergentes. Nous comparerons des individus après une phase de jeûne de 12 h (avec accès à de l'eau) à des individus ayant eu un repas suite aux 12 h de jeûne (24 animaux au total, soit 6 animaux par groupe, un nombre minimal au vu des différences attendues, conforme à la nécessité de Réduire le nombre d'animaux utilisés). Ces animaux, représentatifs des deux lignées divergentes, seront hébergés en conditions d'élevage à des fins de recherche agronomique dans un milieu enrichi avec des cordes, toiles en tissus et pierres à lécher (afin de Raffiner au mieux cette expérimentation).

13926 La néphropathie à 2,8 Dihydroxyadénine (2,8 DHA) est une néphropathie rare, touchant environ 1/100 000 individus, secondaire à un déficit autosomique récessif en adénine phosphoribosyltransférase. Elle conduit à la survenue de calculs dans les voies urinaires et au dépôt de cristaux dans le parenchyme rénal. Sans traitement spécifique la maladie conduit à la survenue d'une insuffisance rénale terminale et à la récurrence précoce de la pathologie en transplantation, menant à la perte précoce des greffons.

Nos constatations tirées d'un registre de biopsie rénale porteuse de cette pathologie montrent la participation importante d'un processus inflammatoire lors du diagnostic.

Nous formulons l'hypothèse que l'adjonction de traitement anti-inflammatoire puisse améliorer l'évolution de cette néphropathie et réduire l'impact sur la fonction rénale que ce soit lors du diagnostic sur reins natifs ou en post transplantation.

Nous utiliserons le modèle de néphropathie basé sur la supplémentation en adénine dans les apports alimentaires d'un modèle murin et exposerons différents groupes au traitement de référence (allopurinol) et/ou à des cortico-stéroïdes(dexaméthasone) et/ou à des anti IL1-beta (anakinra, molécule utilisée dans le traitement des rhumatismes inflammatoires).

Notre modèle et nos procédures expérimentales sont optimisées selon la règle des 3R Les animaux sont hébergés dans des portoirs ventilés les animaux sont sur une litière cellulose munie d'enrichissement : des billes de cellulose que les animaux vont déployer et faire des nids ainsi que des buchettes de peuplier pour qu'ils puissent ronger. En effet, le modèle *vivo* est indispensable dans une visée pré-thérapeutique (remplace). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum (réduire) à savoir 4 groupes de 8 animaux (contrôles, traitement de référence par allopurinol, allopurinol+anti-IL1beta, allopurinol + corticoïdes, soit 4*8= 32 animaux). Dans le cadre du « raffinement », aucune intervention invasive n'est envisagée en dehors des injections sous-cutanées de dexaméthasone et d'anakinra.

13927 La rate, véritable filtre du sang, protège l'organisme contre des maladies infectieuses, notamment les bactéries disséminées dans la circulation sanguine. La capacité de réagir contre ces pathogènes

est régulée par des cellules immunitaires, appelées les macrophages. Notre recherche porte sur une molécule, RANKL, qui diminue en quantité avec l'âge chez l'homme et plus particulièrement chez les femmes ménopausées. Nous souhaitons savoir si RANKL régule le nombre de macrophages et ainsi la réponse immunitaire contre des infections. Ces résultats auront alors un impact important pour la santé de l'homme.

Remplacement : La rate est un organe complexe comportant une multitude de cellules immunitaires localisées à des endroits stratégiques pour garantir une réponse immunitaire précise et adaptée aux types d'infection. A l'heure actuelle, une approche alternative aux expériences chez l'animal qui reproduit ces complexités de l'organe n'existe pas.

Raffinement : Dans le souci de raffinement, les injections d'un immunogène non-pathogène pour l'homme sont effectuées sur des souris sous anesthésie générale et par un personnel compétent. Les animaux sont observés quotidiennement. Nous avons établi une grille de score afin d'évaluer la souffrance. Des points limites prédictifs adaptés à chaque procédure ont été déterminés afin d'interrompre les procédures limitant ainsi la douleur animale à son minimum. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi comprenant des nids et frisure de carton.

Réduction : Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature et acquises par les laboratoires, notamment sur les techniques permettant d'activer et de mesurer la réponse immunitaire et la présence des macrophages afin de réduire le nombre de souris. Le nombre total des souris pour ce projet est de 200 souris, dont 40 souris pour la reproduction. Le nombre d'animaux est le minimum permettant une analyse de nos données par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni.

13928 L'insuffisance rénale (IR), est une maladie fréquente. En France, la prévalence chez les adultes est évaluée à 10%. Bien que l'on retrouve souvent les facteurs de risque CV classiques (hypertension, diabète, obésité...) chez les patients souffrant d'IR, les données démontrent que l'IR, même modérée, est un facteur prédictif de la mortalité cardiovasculaire (CV). Malgré les progrès accomplis, les mécanismes régissant les interactions cardio-rénales ne sont qu'incomplètement compris.

On sait toutefois que l'inflammation joue un rôle pivot dans le développement de l'insuffisance rénale et de ses complications CV, de plus, de récentes études suggèrent que le microbiote intestinal pourrait moduler la sévérité de ces complications.

L'aldostérone (hormone minéralocorticoïde) est connue pour réguler la balance hydro-sodée dans le rein. Son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde (RM) est un récepteur nucléaire qui régule l'expression de gènes spécifiques.

En plus de l'épithélium rénal et intestinal, le RM est exprimé dans de nombreuses cellules non épithéliales telles que celles du cœur (cardiomyocytes), des vaisseaux (cellules endothéliales et musculaires lisses) et du rein (cellules mésangiales et podocytes). Expérimentalement, l'administration chronique d'aldostérone associée à une surcharge sodée induit une fibrose du cœur (interstitielle et périvasculaire), des vaisseaux, et du rein (glomérulosclérose et fibrose interstitielle).

Il est désormais bien établi qu'une activation inappropriée du RM s'accompagne de dommages structurels cardiaques et rénaux. Les données recueillies chez l'Homme et l'animal montrent que l'inflammation (infiltration de monocytes et macrophages, augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires) joue un rôle critique dans le remodelage induit par l'aldostérone. L'activation du RM par l'aldostérone favorise l'inflammation de plusieurs façons, notamment en stimulant la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui activent les facteurs de transcription pro-inflammatoires. La modulation des immunités innée et adaptative par le RM dans les organes affectés par l'IR (rein, cœur, intestin...) peut également jouer un rôle critique dans l'instauration et/ou le maintien du remodelage rénal, vasculaire et cardiaque. Cet effet sur l'inflammation intestinale pourrait par ailleurs se répercuter sur la qualité du microbiote.

Les comorbidités cardiovasculaires de l'insuffisance rénale sont dramatiques et impactent la survie des patients. Il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents des interactions entre

rein et cœur par exemple ou rein et microbiote, mais également d'identifier des thérapeutiques permettant de limiter ces comorbidités. Notre hypothèse est que l'inflammation induite par le RM joue un rôle central dans ces comorbidités cardiovasculaires, soit directement au niveau de l'organe cible, soit indirectement en affectant le microbiote intestinal. L'objectif du projet est de comprendre :

1-Les effets de nouveaux antagonistes non-stéroïdiens ayant moins d'effets secondaires délétères dans l'insuffisance rénale en particulier l'hyperkaliémie.

2-les mécanismes et types cellulaires impliqués dans l'inflammation induite par l'activation du RM de manière tissu spécifique, et les effets protecteurs des antagonistes du RM sur la progression de l'insuffisance rénale chronique.

3-le rôle de l'activation du RM dans l'impact cardiovasculaire et sur le microbiote lors de l'insuffisance rénale chronique.

D'après notre expérience dans des modèles animaux proches de ce modèle d'IR et en se basant sur la littérature ainsi que sur le résultat d'un logiciel de calcul du nombre d'animaux nécessaire en (G-Power), nous aurons besoin d'un groupe de 10 souris par modèle transgénique et par condition pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier les différences statistiques entre les résultats (un total de 1600 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans).

Mise en œuvre pratique des 3R :

- Réduction

Sous certaines conditions, nous pourrions utiliser les résultats des groupes contrôles obtenus au cours de séries expérimentales précédentes, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Cette substitution ne sera possible que si, par exemple, l'âge des animaux est le même et si les conditions d'hébergements des animaux sont les mêmes.

De plus, nos modèles de souris intéressent plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes. Donc les organes sur lesquels ne nous travaillons pas pourront être récoltés par d'autres équipes afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement

Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude. Les mesures de raffinement incluent une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie pré et post-opératoire lors de l'induction de l'IR chez les animaux, les protocoles thérapeutiques que nous allons utiliser sont maîtrisés et utilisés régulièrement dans notre équipe. Les points limites ainsi que les critères d'interruption d'expérimentation sont pré-définis et un suivi rigoureux des animaux est mis en œuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

- Remplacement

Nos modèles animaux sont utilisés pour étudier des mécanismes physiologiques visibles uniquement à l'échelle de l'animal. Toutes les études plus spécifiques sur des mécanismes plus délimités seront effectuées avec des cultures cellulaires.

13929 Un projet de développement de vaccin pour les maladies du lapin est en cours de développement au sein d'une animalerie partenaire et dispose d'une autorisation de projet en cours de validité. Tous les essais sur les lapins prévus au cours de ce projet sont encadrés réglementairement et constituent des pièces du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) nécessaires à la commercialisation du vaccin. Pour une procédure, certains lapins inclus dans ce projet doivent être hébergés dans notre établissement utilisateur, ce qui justifie la présente demande d'autorisation de projet.

Le nombre maximal de lapins impliqué dans cette procédure est estimé à 420 lapins. Le nombre de lapins à inclure dans chaque procédure est fixé par la pharmacopée européenne.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;
- Manipulation des lapins dans des boxes isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié.
- Enrichissement de l'environnement : mise à disposition des animaux de cellulose compressée contenant des fruits secs.

13930 La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ou DMLA est aujourd'hui la première cause de handicap visuel chez les personnes âgées de plus de 50 ans dans les pays développés. Cette maladie est une atteinte de la rétine de l'œil.

Il existe plusieurs traitements de cette pathologie mais aucun d'eux n'est satisfaisant à l'heure actuelle car ils ne peuvent pas la guérir. Ils sont indiqués dans les phases actives de la maladie mais reste inefficaces sur les formes cicatrisées ou trop évoluées. Il semble que des traitements préventifs et/ou de bonnes habitudes alimentaires puissent réduire les risques d'évolution vers une forme avancée de la maladie. Le médecin ophtalmologiste peut prescrire des compléments alimentaires pour couvrir ou renforcer les besoins quotidiens en antioxydants, lutéine et oméga-3.

Nous collaborons avec des laboratoires pharmaceutiques afin de développer un programme de recherche visant à établir si un nutraceutique enrichie en resvératrol (un polyphénol de la vigne) pouvait exercer une action bénéfique, dans le cadre de la DMLA, supérieure à une formulation commercialisée ne contenant pas de resvératrol.

Notre modèle expérimental de DMLA est initié, chez la souris, par des impacts lasers au niveau de l'œil. 100 souris femelles C57B6/6J, réparties en 5 groupes, seront complémentées en amont avec ou sans formulations. Les animaux seront complémenté 4 semaines avant impacts laser, puis cette alimentation est maintenue jusqu'à mise à mort des animaux. Les impacts laser sont réalisés sous anesthésie générale des animaux, et dès lors, les animaux sont surveillés au jour le jour (vigilance, comportement, poids...). Les animaux seront mis à mort 21 jours après impact laser, ce délai étant suffisant pour visualiser les effets des différentes formulations. Afin de pouvoir se conformer au principe de la règle des trois R (Remplacer, Réduire et Raffiner), nous avons préalablement à cette demande effectuée des expériences préliminaires sur une lignée cellulaire de manière à optimiser les conditions, nous avons réduit le nombre d'animaux nécessaire à cette étude afin de permettre une étude statistique sans utiliser d'animaux en excès. Enfin, nous avons raffiner de manière à réduire la souffrance et le stress de l'animal en éliminant notamment toute forme d'administration par injection ou par gavage, l'administration du nutraceutique se fera par absorption sur une petite céréale.

13931 La communauté scientifique utilise la souris comme modèle animal pour faire progresser la recherche biologique et médicale.

Le service de rederivation/reviviscence de notre laboratoire est un maillon essentiel pour les besoins de la communauté scientifique.

Nous apportons une réponse aux animaleries dont les contraintes sanitaires sont devenues de plus en plus exigeantes : sans interaction liées aux pathogènes les résultats scientifiques sont cohérents. Cela évite d'utiliser des animaux dont les résultats seront non interprétables et par voie de conséquence cela réduit le nombre d'animaux utilisés !

Nous proposons 2 prestations, la reviviscence et la rederivation ; ses 2 techniques nous permettent d'obtenir des animaux avec un statut sanitaire contrôlé : la reviviscence se fait à partir d'embryons ou de sperme congelé ; quant à la rederivation elle se fait à partir de jeunes femelles mise en accouplement.

Après validation du statut EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiques) des petits nés les animaux peuvent être, selon la demande, expédiés dans toutes animaleries de statut EOPS ou élevés sur notre site.

Pour la réalisation d'une reviviscence il faut compter au maximum 9 animaux (comprenant des mâles génétiquement modifiés, des femelles consanguines et des mères porteuses)

Pour la réalisation d'une rederivation il faut compter au maximum 19 animaux (comprenant des femelles consanguines et des mères porteuses).

En plus de cela pour les 2 types de prestations confondu nous utilisons une moyenne 60 mâles vasectomisés/an pour la production des femelles pseudos gestantes.

Pour le maintien des petits issus d'une reviviscence/rederivation : dans le cas d'une lignée à phénotype dommageable, une nouvelle demande d'autorisation de projet sera réalisée.

Au total pour 5 ans nous utilisons au total 13300 souris.

Les douleurs engendrées aux animaux sont :

-pour les femelles mise en accouplement : l'injection d'hormones en mode intra-péritonéale (à raison de 2 injections à 48h d'intervalle)

-pour les mères porteuses et pour les mâles vasectomisés : l'injection d'anesthésique en mode intra-péritonéale de façon à réaliser la réimplantation d'embryons et la vasectomie qui sont des opérations chirurgicales de courtes durées.

Ce projet est totalement en adéquation avec la règle des 3R=

-REDUIRE :

Pour les mâles vasectomisés et pour les femelles qui sont mise en accouplement avec ses derniers ; nous essayons d'adapter au maximum le nombre d'animaux utilisé en fonction de notre activité.

Page 23. Informations Administratives et Réglementaires

3. 1. L'Etablissement Utilisateur

3. 1. 1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

Pour la reviviscence, grâce à la maîtrise de la microchirurgie, le nombre de femelles anesthésiés/réimplantés est calculé au plus juste : pour chaque lignée, 2 femelles sont souvent suffisantes ; Pour la rederivation c'est la qualité des embryons qui nous oblige de temps en temps à effectuer de nouvelles réimplantations.

Pour la rederivation à partir de sperme congelé, un nouveau milieu de superovulation nous permet de diviser par 2 le nombre de femelles utilisé pour la FIV. Seulement 5 femelles (au lieu de 10) sont suffisantes pour obtenir un minimum de 30 embryons viables.

Pour terminer, pour la reviviscence : l'utilisation de femelles prepubères et une superovulation de ses dernières avant la mise en accouplement permet d'augmenter de manière significative le nombre d'embryons par femelle et donc de réduire leurs utilisations.

-RAFFINER :

Pour l'ensemble de nos microchirurgies, nous attachons beaucoup d'importance au bien-être des animaux pendant et après l'opération :

-Une injection d'anesthésique (kétamine, xylazine) en intra-péritonéale suffit à endormir les animaux et à empêcher toute sensation de douleur.

-De l'ocry-gel est administré sur les yeux des souris pour éviter un assèchement de la cornée.

-Un tapis chauffant réglé à 37°C est installé sous l'animal pendant l'opération afin d'éviter toute sensation de froid.

Autant que possible les animaux sont hébergés en groupe sociaux ; ils ont aussi des enrichissements de milieux mis à disposition.

Nous avons un point limite adapté et prédictif ; d'après notre recul sur ce projet : nous pouvons dire que l'ensemble des animaux utilisés aux cours de ce projet ne souffrirons pas et il n'y aura pas de dommage.

-REEMPLACER :

L'objectif de ce projet étant la production d'animaux EOPS pour divers projets de recherche, il est donc impossible de remplacer les animaux par de la culture *in vitro* ou autre.

Dans la plupart des cas, l'utilisation d'animaux ayant un statut sanitaire contrôlé et sain permet d'utiliser moins d'animaux et d'avoir des résultats plus concluants.

Il a déjà été démontré à plusieurs reprises que l'état sanitaire des différentes lignées de souris utilisées pour la recherche pouvait interférer dans le résultat des études menées.

13932 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, chronique et progressive. Elle présente un taux de mortalité supérieur à 70% à 5 ans après le diagnostic. Il n'existe pas de thérapie efficace à l'heure actuelle. La fibrose pulmonaire est une lésion des poumons caractérisée par une fibrose, c'est-à-dire la présence d'un excès de tissu fibreux. L'accumulation de fibroblastes et la sécrétion en excès de tissus fibreux par ces derniers jouent un rôle central dans cette maladie. Les fibroblastes sont des cellules d'aspect fusiforme présentes normalement dans le tissu ; elles sont parfois appelées cellules de soutien. La FPI se caractérise ainsi par une cicatrisation anormale et chronique du poumon menant à la destruction des alvéoles pulmonaires. Les alvéoles pulmonaires sont de minces sacs creux qui prolongent les voies respiratoires, où se déroulent les échanges gazeux avec le sang. Lors de la FPI, il se met donc en place un mécanisme de réparation anormal au cours duquel on assiste à une réactivation de phénomènes impliqués dans le développement embryonnaire.

Des études *in vitro* ont identifié un facteur de transcription du développement potentiellement impliqué dans le comportement anormal des fibroblastes au cours de la FPI. Un facteur de transcription (FT) est une protéine contrôlant l'expression d'un gène au niveau de l'ADN dans le noyau des cellules. Il existe une perturbation de l'expression de ce FT dans le poumon de fibrose. Ceci pourrait contribuer à cette maladie. En effet, peu présent en temps normal dans les tissus adultes, l'expression de ce FT se trouve augmentée dans le noyau des fibroblastes chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Ces résultats *in vitro* ont été confirmés sur des fibroblastes en culture. Pour étudier le rôle de ce FT au cours de la fibrose pulmonaire, nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiée pour enlever ce gène spécifiquement chez la souris adulte.

Dans le cadre de ce protocole (durée : 5 ans), la validation du rôle *in vivo* de ce FT comme cible thérapeutique dans la fibrose pulmonaire chez la souris sera testée. Une procédure par instillation intratrachéale sous anesthésie générale de différentes substances favorisant la survenue de la fibrose sera mise en place. Ceci permettra d'étudier différents aspects et phases du développement de la fibrose pulmonaire. Nous utiliserons donc une lignée transgénique afin d'inactiver ce gène chez la souris adulte après injection intrapéritonéale d'une substance non toxique sur souris adultes vigiles.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation de souris pour modéliser le développement de la fibrose pulmonaire. Le nombre d'animaux utilisé sera celui nécessaire afin d'atteindre les objectifs du projet. La pathologie humaine de la fibrose pulmonaire affectant les adultes nous utiliserons des souris adultes. En plus d'un suivi attentif, nous avons également défini des points limites stricts afin de privilégier et respecter le bien-être des animaux impliqués dans ce protocole. Différents points limites stricts associés à la fibrose pulmonaire seront considérés. Sur la base d'une grille d'évaluation, l'observation stricte et précoce de ces points limites conduira à la sortie immédiate de l'animal du protocole et à son euthanasie.

En respectant ces exigences de remplacement (utilisation de la culture cellulaire), de réduction (calcul du nombre minimum d'animaux à utiliser) et de raffinement (utilisation des prélèvements animaux pour plusieurs types d'analyses) (3Rs), nous avons calculé que le nombre d'animaux nécessaire à cette étude sera d'un total de 448 souris. A la fin des procédures de ce protocole, tous les animaux sont euthanasiés pour le recueil d'organes.

13933 La pisciculture est une filière de production animal en plein essor à travers le monde et nécessitant une profonde réflexion sur l'alimentation des poissons afin de s'affranchir de l'usage des farines et huiles de poissons. Le poisson d'élevage est en voie de devenir l'une des principales sources de protéines destinées à l'alimentation humaine à l'horizon 2050. Les pêches minotières sont stables et la production mondiale de farine et huiles de poissons ne peut plus satisfaire les besoins de cette filière en pleine extension. Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la substitution, l'usage total des végétaux terrestres n'a jamais été atteint en raison d'une forte dégradation des performances de croissance des poissons. La micro algue marine cultivée en extérieur semble avoir le profil idéal pour remplacer partiellement les protéines et lipides issus des pêches minotières.

L'enjeu principale du projet sera de formuler et d'évaluer un aliment pour le Bar à base de micro algues marines cultivées en milieu ouvert afin d'anticiper la crise d'approvisionnement de farine et de l'huile de poissons dans les aliments aquacoles. De plus cette substitution pourra indirectement participer à la réduction de l'effort de pêche et à la conservation des espèces marines aujourd'hui exploitées pour ses qualités protéiques et surtout lipidiques. Il s'agira en pratique de déterminer si cette nouvelle formulation avec cette nouvelle source de matière première est capable d'assurer une durabilité technique, économique et environnementale pour les systèmes aquacoles français. Il s'agit d'un test d'alimentation avec un aliment témoin au profil commercial et 3 niveaux de substitution par une farine de consortium naturel d'algues marines.

Avec les acquis du passé sur des expérimentations du même type, ainsi que la définition statistique des degrés de liberté limitants dans l'analyse, le nombre de poissons utilisés par traitement a été réduit à 600 individus (soit une réduction de 240 individus). Une attention particulière est portée sur la méthodologie de manipulation et de stockage dans les bassins en relation avec les travaux antérieurs issus du laboratoire et la bibliographie existante. Pour réduire la souffrance et le stress, les poissons seront manipulés sous anesthésie pour toute les mesures individuelles et élevés dans des enceintes appropriées.

13934 Avec le vieillissement de la population, l'incidence du rétrécissement aortique calcifié (RAC) augmente ; les complications liées au RAC (Insuffisance cardiaque, Angor d'effort) augmentent aussi et ont des conséquences majeures en termes de Santé Publique (Diminution de la qualité de vie, hospitalisations, recours à la Chirurgie Cardiaque). Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement du RAC en dehors du remplacement valvulaire aortique cardiaque par bioprothèse ou prothèse mécanique, par voie chirurgicale ou trans-artérielle.

L'interleukine 8 (IL-8) est une cytokine déjà connue pour son implication dans la calcification vasculaire. Les travaux de recherche permettent de suggérer un effet pro-calcifiant de celle-ci au niveau artériel.

Le but de ce projet est d'évaluer l'impact d'un traitement antagonisant l'IL-8 dans le modèle de rétrécissement aortique calcifié obtenu par implantation sous-cutanée de valves aortiques chez le rat. Ce modèle d'étude de calcification valvulaire aortique est largement utilisé et depuis longtemps dans le monde industriel pour étudier notamment les caractéristiques des bioprothèses utilisées lors des remplacements valvulaires aortiques par voie chirurgicale chez l'Homme.

Pour limiter le nombre d'animaux, une étude préliminaire sera effectuée avec un effectif d'animaux réduit permettant de confirmer la faisabilité et la pertinence de ce projet. Cette étude préliminaire portera sur un groupe de 10 rats. Les valves aortiques implantées en sous-cutanée seront issues de valves humaines.

Les rats seront suivis par méthodes non-invasives : Échographie transthoracique (ETT), Scanner (TDM) et radiographies standards. Ces 10 rats seront répartis selon 3 groupes : 2 Contrôle, 4 injection sous-cutanée (SC) d'antagoniste d'IL-8 au site d'implantation et 4 injection intra-péritonéale (IP) d'antagoniste d'IL-8. Les rats seront, en fin d'étude préliminaire, sacrifiés à 2 semaines (n =5) et à 4 semaines (n=5) post-implantation permettant l'étude histologique des valves implantées et les prélèvements sanguins seront réalisés après sacrifice.

Ainsi, une fois la faisabilité et la pertinence du projet établi, celui-ci sera appliqué sur un effectif de 64 rats. Les 64 rats opérés seront ensuite répartis en 4 groupes de 8 rats (Contrôle, injection de l'antagoniste de l'IL-8 en sous-cutané et en intra-péritonéal, injection SC d'un calci-lytique).

Le suivi sera assuré comme dans l'étude préliminaire par méthodes non-invasives (ETT, TDM et Radiographies).

Le sacrifice des animaux se fera à 2 (pour n=32) et 4 semaines (pour n= 32), permettant une étude nécroptique des valves aortiques natives et sous-cutanées (soit multipliée par 2, car la valve native du rat recevant le greffon ectopique sera aussi analysée). Les prélèvements sanguins seront effectués après sacrifice.

Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ces expériences ne peuvent à l'heure actuelle être réalisées qu'avec l'utilisation de modèles animaux, la complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le RAC ne permettant pas les études *in silico*. Le choix du modèle animal s'est porté sur le rat car par rapport à la souris, au mouton ou au porc, il s'agit de l'espèce la moins coûteuse et avec une taille suffisamment grande pour réaliser une implantation sous-cutanée chirurgicale simple.

De plus, le raffinement vient de la possibilité de disposer de conditions d'hébergement et d'enrichissement de milieu optimaux d'usage courant sur la plateforme animalerie, ainsi que la présence d'un personnel rodé en termes de suivi clinique et de surveillance du bien-être des animaux, avec application immédiate de critères d'arrêt. L'utilisation de greffons (valves aortiques cardiaques) venant d'une autre espèce animale est justifiée par la nécessité d'un processus de rejet à l'origine de la calcification de la valve ectopique. Il s'agit d'un modèle amplement utilisé et connu.

Le nombre d'animaux est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux.

Ce projet intéressant l'interleukine-8 et son impact cardio-vasculaire justifiera la mise en place d'une banque d'organes pour mutualiser les échantillons au sein du laboratoire (à la fois sur les valves calcifiées et sur les organes des rats nécropsiés) permettant d'étudier l'impact de l'IL-8 sur les autres organes (effets secondaires potentiels).

13935 Le décollement de rétine touche chaque année une personne sur mille et représente environ 6000 nouveaux cas par an en France. Il s'agit d'une affection potentiellement cécitante nécessitant un traitement chirurgical d'urgence. Le décollement de rétine correspond à une séparation de la rétine neurosensorielle de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ceci autorisant le passage de liquide depuis la cavité intraoculaire jusque sous la rétine neurosensorielle. Les traitements actuels visent à créer une cicatrice étanche qui empêche le passage du liquide intraoculaire sous l'espace sous-rétinien, le pompage du liquide effectué par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien permettant alors de « recoller » la rétine au fond d'œil. Grâce à l'amélioration ces techniques chirurgicales, le taux de succès anatomique à la première intervention s'élève à plus de 80%. Cependant, malgré le repositionnement correct de la rétine neurosensorielle, la récupération visuelle est parfois limitée, principalement en raison de phénomènes liés à la mort des photorécepteurs pour lesquels aucun traitement préventif n'existe à l'heure actuelle.

L'acide docosahexaénoïque ou DHA est un acide gras polyinsaturés appartenant à la famille des oméga-3. Le DHA, qui est présent en grandes quantités dans la rétine et plus particulièrement dans les photorécepteurs de la rétine sensorielle, est connu pour y exercer plusieurs types de fonctions protectrices. La prévention de la mort cellulaire, encore appelée apoptose, en fait partie puisqu'il a été largement démontré *in vitro* que le DHA est capable de ralentir la mort des photorécepteurs lorsqu'ils sont soumis à divers stress (stress oxydatif, stress inflammatoire, exposition à la lumière bleue...). Cependant, aucune étude n'a à ce jour envisagé l'intérêt potentiel du DHA dans la récupération visuelle suite à un décollement de rétine. L'objectif de la présente étude est donc de tester pour la première fois les propriétés bénéfiques du DHA dans la prévention de l'apoptose des photorécepteurs et de la perte visuelle suite à un décollement de rétine.

Pour cela, nous utiliserons deux groupes de 36 souris, pour un total de 72 animaux, sur lesquels nous induirons un décollement de rétine sur un œil. Ceci sera possible à travers une injection sous-rétinienne, qui représente actuellement le modèle le plus utilisé pour mimer le décollement de rétine tel qu'observé chez l'homme. Nous évaluerons à la fois la persistance de la bulle de liquide responsable du décollement par imagerie du fond d'œil, mais aussi la fonctionnalité rétinienne par électrorétinographie, ainsi que les mécanismes biochimiques et moléculaires liés à l'apoptose en réponse à un traitement avec du DHA sous forme de collyre. La mise en œuvre du projet s'inscrira dans la règle des 3R.

Réduire : Dans cette étude, nous utiliserons deux techniques non invasives, c'est-à-dire qui ne nécessitent pas la mise à mort d'animaux. Il s'agit de l'imagerie du fond d'œil et l'électrorétinographie, pour étudier respectivement la persistance du décollement et l'acuité visuelle des animaux. Pour les analyses biochimiques et moléculaires, et bien que le nombre optimal soit de 10 animaux par groupe en raison des fortes variations interindividuelles, nous n'utiliserons que 8 animaux par groupe, qui est le nombre minimal nécessaire afin d'avoir des différences significatives du point de vue statistique. Pour l'étude de l'apoptose par immunohistologie, qui est une mesure non quantitative, nous nous limiterons à 4 animaux par groupe.

Raffiner : Chaque procédure sera réalisée en réduisant ou supprimant la douleur, en limitant la souffrance et le stress des animaux. A cette fin, des anesthésiques seront utilisés lors de l'induction du décollement de rétine ainsi que les étapes d'imagerie et d'électrorétinographie. La présente demande a été soumise à la Structure chargée du Bien-Etre Animal (SBEA) du laboratoire, dont les commentaires ont permis d'en améliorer le contenu, ceci, en vue de la mise en place de conditions optimales d'hébergement et d'utilisation des animaux.

Remplacement : L'œil est un organe très complexe composé de structures neuronales et non neuronales, elles-mêmes associées à des éléments des systèmes vasculaires. Le fonctionnement coordonné de toutes ces structures assure la physiologie globale des photorécepteurs de la rétine neurosensorielle. Seule une étude macromorphologique du globe oculaire sur un modèle animal peut rendre compte des paramètres évalués. En particulier, les capacités des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien à pomper le liquide dans l'espace sous-rétinien et, ainsi à participer à la survie des photorécepteurs, ne peuvent pas être modélisés *in vitro*.

13936 Les vascularites (maladies inflammatoires des petits vaisseaux sanguins) connaissent des épisodes de rémissions, après des périodes d'inflammation aiguë, et pour des raisons inconnues les symptômes réapparaissent au niveau du rein. Les conséquences de cette inflammation chronique sont une accumulation massive de collagène (fibrose), une perturbation des fonctions rénales (insuffisance rénale), l'hypertension, et potentiellement la mort du patient. Les cellules responsables du maintien de la structure du rein (fibroblastes) pourraient contribuer à l'inflammation chronique, ou au contraire, à sa résolution. Les fibroblastes rénaux sont « activés » au cours des vascularites. Le rôle des fibroblastes lors de la cicatrisation est connu, cependant l'impact de l'inflammation chronique sur la fonction « cicatrisante » des fibroblastes est mal compris. Les multiples fonctions des fibroblastes à l'état de base et pendant l'inflammation aiguë ont été mis en évidence dans un modèle de fibrose pulmonaire murin ; cette étude montre que l'inflammation transforme les fibroblastes en super-producteur de collagène. Nous souhaitons savoir si les fibroblastes rénaux se « transforment » grâce à l'inflammation chronique lors des vascularites. L'inhibition de l'inflammation et de la reprogrammation des fibroblastes constituerai une nouvelle cible thérapeutique lors des vascularites. Pour étudier l'inflammation chronique, nous développerons des modèles de vascularites basés sur des injections séquentiels, intraveineuse (sinus rétroorbital) d'anticorps spécifiques du modèle (vascularite Goodpasture ou ANCA+), pour cibler le réseau vasculaire rénal. Critères d'évaluations des modèles expérimentaux: fonctions rénales, protéinurie, hématurie, fibrose, inflammation, structure tissulaire. Caractérisation des fibroblastes (activation/prolifération/survie/production de collagène) et de leur relation avec les leukocytes chez la souris (et en parallèle chez l'homme).

La fibrose est le meilleur indicateur de la survie rénal lors des vascularites humaines.

Objectifs:

- Créer des modèles de vascularite chronique chez la souris
- Identifier les cellules inflammatoires/molécules favorisant/prévenant la fibrose
- Étudier la re-programmation des fibroblastes par l'inflammation sur les fonctions rénales/fibrose

Les modèles de vascularite chez la souris sont très aigus: forte dose d'anticorps, destruction massive du rein, peu de fibrose. Pour modéliser la maladie humaine, une dose minimale d'anticorps (injection i. v., sinus retro-orbital, animal anesthésié) capable d'induire des lésions rénales transitoires (inflammation/fibrose/protéinurie) sera déterminée dans la procédure 1 qui durera 14 jours. Les effets de cette dose sur le remodelage tissulaire seront étudiés (histologie) en cinétique pendant 14 jours (procédure 2, sacrifice à différents temps). Les mêmes paramètres seront étudiés après 2 injections séquentielles d'anticorps spécifiques du modèle, J0 et J14 (intraveineuse, rétro-orbital, animal anesthésié). Les animaux seront sacrifiés après la 2nd injection, en cinétique, afin d'analyser le remodelage tissulaire rénal entre J14 & J28 (Procédure 3). Pour connaître les cellules/molécules inflammatoires impliquées dans la re-programmation des fibroblastes dans ces modèles murin, divers traitements pharmacologiques (utilisés dans d'autres modèles et publiés dans des journaux scientifiques) et souris transgéniques seront utilisés (Procédure 4). Les traitements seront utilisés en:

- préventif, avant l'induction du modèle (sacrifice à J14)
- thérapeutique, avant la 2nd injection d'anticorps spécifiques (sacrifice J28)

La transformation des fibroblastes et les fonctions rénales seront étudiées. La procédure 5 consistera au transfert de fibroblastes rénaux « sensibilisés ». L'animal donneur recevra l'injection d'anticorps spécifiques (intraveineuse, rétro-orbital, animal anesthésié) et sera euthanasié (J10) pour purifier les fibroblastes rénaux. Le transfert cellulaire chez le receveur sera effectué chirurgicalement, sous anesthésie, en exposant le rein (injection sous la capsule rénale). Après une période de récupération, les souris receveuses recevront une injection d'anticorps spécifiques du modèle (intraveineuse, rétro-orbital, animal anesthésié). Les animaux receveurs seront sacrifiés 14 jours après l'injection d'anticorps pour étudier le remodelage tissulaire/fonctions rénales.

Le nombre d'animaux prévu pour ce projet de 3 ans est de 648.

Règle des 3R : Remplacement : L'absence de système in vitro aussi complexes que l'organisme humain ne nous permet pas de remplacer l'utilisation des animaux pour comprendre la pathologie et développer de nouveaux médicaments. La création de modèles de vascularites qui modélisent fidèlement la maladie humaine chez la souris permettra le développement de nouveaux médicaments.

Réduction : Afin de minimiser l'utilisation du nombre d'animaux (si cela est possible) nous utiliserons des modèles in vitro à partir de culture cellulaire (par exemple pour l'étude de la mémoire inflammatoire des fibroblastes). Le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats fiables a été calculé pour obtenir une réduction de 30% de la fibrose rénale lors de traitements pharmacologiques, basé sur les données de la littérature ; le minimum est de 10 animaux par groupe.

Raffinement : Les animaux seront surveillés quotidiennement et, des mesures visant à améliorer le bien-être (enrichissement) seront prises. Afin de minimiser le stress des animaux, ceux-ci seront placés en groupe avec des éléments d'enrichissements, comme des bâtons à ronger, des éléments permettant la nidification ainsi qu'un accès illimité à la nourriture et l'eau de boisson. Si des signes de douleurs venaient à apparaître (prostration, manque d'hygiène, inactivité prolongée, inappétence) alors les animaux recevront des anti-douleurs, avant et pendant la procédure. Si les signes de douleurs persistent plus de 72h, les animaux seront sacrifiés (sans attendre la fin de la procédure). Afin de suivre l'évolution de l'atteinte rénale dans ces nouveaux modèles murins de vascularite, la protéinurie sera monitorée régulièrement (à l'aide de bandelettes urinaires). Bien que la protéinurie soit un paramètre important pour savoir si le rein a été ciblé, elle ne constitue pas un point limite (aucune valeur de protéinurie n'est prédictive d'une atteinte mortelle du rein chez la souris). En revanche, une protéinurie élevée (>100mg/ml), associée au développement d'ascite

(gonflement de l'abdomen de la souris due à la rétention d'eau, non douloureux) signifie que les reins sont affectés. L'apparition d'ascite est considéré comme point limite. A l'apparition des points limites (ascite, perte de poids >20%, sang urines/voies respiratoires, score déshydratation ≥ 4) les animaux concernés seront sacrifiés (avant la fin de la procédure).

13937 1-Contexte scientifique, médical et social

Un anévrisme artériel se caractérise par une dilatation progressive du calibre d'une artère et présente un risque de rupture et d'hémorragie aigue. En pratique courante, on peut distinguer les anévrysmes intracérébraux (AIC) et les anévrysmes de l'aorte abdominale (AAA). Les AIC et les AAA s'accompagnent respectivement en cas de rupture d'hémorragie cérébrale et d'hémorragie interne, mortelles dans 50% des cas.

Les AIC et les AAA représentent un problème de santé publique (présents dans 5% de la population générale) et sont pourvoyeurs d'une mortalité importante. Ils génèrent également des couts de santé non négligeables (traitement, séquelles fonctionnelles).

La formation des AIC et des AAA est imparfaitement connue. Le risque de rupture augmente avec le diamètre anévrysmal.

Le traitement des AIC et des AAA constitués est uniquement chirurgical, ce qui représente des risques (anesthésie, accidents vasculaires cérébraux) et des couts importants.

Il n'existe aucun traitement préventif ou médicamenteux permettant de ralentir l'évolution des anévrysmes ou la rupture.

L'acide tranéxamique (ATX) est un antifibrinolytique de synthèse, utilisé en pratique chirurgicale courante pour diminuer les saignements peropératoires lors d'interventions majeures (chirurgie cardiaque ou gynécologique). L'acide tranéxamique inhibe également la plasmine, une protéine impliquée dans la genèse des AIC et AAA.

L'administration d'ATX n'a jamais été utilisée chez l'homme en pratique clinique dans le cadre d'AIC ou d'AAA.

2-Objectifs, dommages vs bénéfiques

L'objectif de l'étude est d'étudier l'administration d'ATX pendant 4 semaines dans des modèles animaux d'AIC et d'AAA chez le rat. Les effets attendus sont une réduction du diamètre anévrysmal et de l'inflammation au sein des anévrysmes dans le groupe recevant de l'ATX versus le groupe contrôle, limitant le risque de mortalité par rupture. Si ces résultats sont positifs, ils pourraient ouvrir la voie à un traitement médicamenteux préventif chez l'homme des AIC et AAA.

Nous utiliserons les modèles d'anévrysmes sacciformes et d'anévrysmes fusiformes chez le rat Wistar mimant respectivement les AIC et AAA.

Un anévrisme sacciforme est une dilatation localisée à un coté de l'artère alors qu'un anévrisme fusiforme est une dilatation de toute la circonférence de l'artère.

Les anévrysmes sont créés en suturant un fragment d'aorte de cobaye décellularisée (dont on a enlevé les cellules, qui ne contient qu'une trame de collagène) soit sur le côté de l'aorte native (modèle sacciforme) soit en l'interposant (modèle fusiforme).

Au sein de ces groupes, deux sous-groupes seront créés : un groupe recevra de l'ATX dans l'eau de boisson pendant 3 semaines après création des anévrysmes et l'autre de l'eau de boisson seule. Les animaux seront euthanasiés 4 semaines après création des anévrysmes et les anévrysmes seront mesurés puis étudiés sur le plan histologique (structure des tissus) et biochimique (étude des paramètres de l'inflammation). Des bilans sanguins seront également réalisés sous anesthésie générale.

Les animaux auront une seule chirurgie (création des anévrysmes) sous anesthésie générale et sous antalgiques. Ils seront nourris normalement. L'euthanasie se fera par une méthode réglementaire.

Le nombre total de rats à inclure dans l'étude est de 70. Le nombre de cobayes à inclure dans l'étude pour prélever les greffons aortiques est de 12.

3-Conformité des 3R

Il n'est actuellement pas possible de simuler l'action de l'ATX sur le développement des AIC ou des AAA *in vitro*. Il n'existe pas de modèle *in vitro* d'AIC ou de d'AAA. De nombreuses publications scientifiques s'appuient sur des modèles expérimentaux d'AIC et d'AAA chez le rat Wistar.

Une analyse statistique a permis de calculer un nombre minimum d'animaux tout en permettant de quantifier une différence entre les deux groupes en termes d'efficacité de l'ATX.

Les animaux seront gardés en animalerie avec respect du rythme jour/nuit murin et accès libre à la boisson et aux nutriments. Ils seront opérés en condition stérile sous anesthésie générale (injection intra-péritonéale). Des antalgiques sont administrés par voie sous-cutanée immédiatement avant et après l'intervention en limitant le stress au maximum (silence opératoire, manipulations douces). Les antalgiques sont continués 48h après l'intervention. Les animaux sont surveillés 4 heures après l'intervention sous lampe chauffante. De retour dans l'animalerie, les rats seront surveillés de façon quotidienne en mesurant des points limites qui, s'ils sont présents, imposent l'euthanasie immédiate de l'animal par une méthode réglementaire.

4-Conclusion

Ce protocole utilise des sujets animaux (rats) pour la création de modèles chirurgicaux expérimentaux d'AIC et d'AAA. Les nuisances et le stress seront limités au maximum. Les animaux seront euthanasiés à la fin du protocole pour analyse sanguines et des tissus. Les données obtenues à l'issue de ce protocole seront mutualisées avec le reste de l'équipe scientifique.

13938 Le système immunitaire est activé en cas d'infection par les bactéries et les virus mais également au cours du développement de cancer. Plusieurs études se sont déjà attachées à identifier le rôle des différents globules blancs au cours d'un cancer et d'autres études ont montré que la chimiothérapie pouvait moduler les proportions des différentes populations de globules blancs. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe montrent que le Cisplatine (une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du poumon) recrute des populations particulières de globules blancs, appelés ILC3 pour innate lymphoid cells ou cellules lymphoïdes innées de type 3. Les données de la littérature indiquent que les ILC3 pourraient être à l'origine de structures appelées TLS (Structures Lymphoïdes Tertiaires) qui pourraient permettre la mise en place d'une réponse immunitaire anti cancéreuse efficace. C'est pourquoi nous souhaiterions étudier (1) ce qu'il se passe dans les tumeurs après que les souris aient reçu un traitement par Cisplatine, et (2) l'impact que cela a sur la réponse anti tumorale.

Les ILC3 partageant l'expression de nombreuses molécules avec les lymphocytes Th17, il est primordial de pouvoir discriminer ces deux types cellulaires. C'est pourquoi, nous utiliserons un modèle de souris RORc ko (souris dépourvue de Th17 et d'ILC3) qui seront reconstituées avec des Th17 différenciés *in vitro*. Ces souris seront alors dépourvues d'ILC3 uniquement, nous permettront alors de discriminer l'impact des ILC3 de celui des Th17 dans des expériences de suivi de croissance tumorale et dans une étude de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral après traitement par cisplatine. Les résultats seront mis en perspective avec ceux obtenus dans des souris sauvages C57Bl6, possédant des ILC3 et des Th17. Nous utiliserons 1 modèle de tumeurs : TC-1 (lignée de cancer du poumon) qui possède un fort infiltrat en globules blancs. Ainsi, les souris C57Bl6 ou RORc ko recevront une injection de 2×10^5 cellules tumorales dans la patte. Dix jours après l'injection, lorsque la tumeur est mesurable, les souris seront traitées avec du PBS ou 6 mg/kg de Cisplatine. Les souris seront mises à mort après 7 jours de traitements ou à la fin de la croissance tumorale, lorsque le grand axe de la tumeur aura atteint 20mm. Les tumeurs seront isolées, dissociées et les populations de globules blancs seront étudiées par cytométrie de flux.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que trois fois et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à une méthodologie afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité

des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs, injection intraveineuse de Th17 et sacrifice) seront réalisées sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Les souris seront maintenues dans des cages ayant un milieu enrichi. Cette étude nécessitera 180 souris C57Bl6, et 150 souris RORc ko.

13939 La leucodystrophie métachromatique (LDM) est une maladie neurodégénérative héréditaire causée par un manque de l'enzyme arylsulfatase A (ARSA) apparaissant généralement autour de l'âge de 2-3 ans. Cette maladie conduit à une perte de la myéline (isolant de la gaine nerveuse) qui est responsable d'une perte des fonctions motrices (trouble de la marche et de l'équilibre) et cognitifs. Dès l'apparition des premiers symptômes chez le jeune enfant, la pathologie se dégrade très rapidement dans les 6 mois qui suivent avec un décès du patient dans les deux ans maximums. Il n'y a pour l'instant, aucun traitement approuvé par les autorités de santé lorsque les symptômes sont déjà présents.

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées a présenté de bons résultats pour traiter les enfants pré-symptomatiques mais est insuffisante une fois les symptômes présents. Ainsi, couplée à cette dernière, la supplémentation en enzyme par voie intrathécale pourrait représenter une thérapie de choix pour le traitement de la LDM mais requiert des injections répétées à l'hôpital.

Il est donc nécessaire de développer des méthodes innovantes permettant une délivrance du médicament plus applicable à la clinique comme, par exemple, les implants basés sur l'encapsulation cellulaire. Ces derniers sont composés d'une membrane de polymères semi-perméables entourant une chambre qui contient des cellules génétiquement modifiées pour produire la protéine d'intérêt thérapeutique. Ainsi, cette nouvelle technologie peut représenter une alternative efficace aux injections répétées. Le dispositif sera implanté en sous-cutané ou en intramusculaire, et les cellules produiront l'ARSA qui diffusera dans le corps entier. Afin de passer la barrière hémato-encéphalique, l'enzyme sera couplée à un peptide dérivant de l'Apolipoprotéine E (ApoE). De plus, la membrane semi-perméable permet aux cellules d'accéder aux nutriments environnants nécessaires pour leur croissance. Cette technologie semble ainsi parfaitement répondre à la nécessité d'un apport rapide, diffus et durable d'enzyme dans le cerveau, la moelle épinière et éventuellement dans les nerfs périphériques pour traiter la LDM.

Des rongeurs seront utilisés pour valider la faisabilité technique de la stratégie dans une espèce de petite taille. Cette preuve de concept est cruciale pour valider la technique c'est-à-dire vérifier entre autres la diffusion de la protéine dans tout l'organisme principalement dans le système nerveux central et l'efficacité thérapeutique du traitement.

3R :

Il est impossible de remplacer l'animal par une stimulation informatique ou d'autres méthodes expérimentales pour tester le concept de cet implant. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe de vétérinaire. L'application de critères d'arrêt standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les animaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Le présent projet limitera le nombre d'animaux au strict minimum nécessaire pour l'interprétation des résultats par des tests statistiques (244 souris).

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.

13940 Notre mode de vie est en décalage avec les rythmes biologiques de notre organisme. Notre alimentation d'aujourd'hui, en plus d'être trop riche en gras et en sucre, ne suit pas ces rythmes circadiens (durée de 24h) qui supposent que l'on mange principalement en début de journée (phase

active) et que l'on jeûne sur environ 12h. Ce mauvais alignement des rythmes alimentaires avec notre physiologie a des conséquences délétères sur notre métabolisme énergétique, notre sommeil et aussi sur nos fonctions cognitives. L'équipe coordinatrice a montré chez l'animal juvénile l'effet délétère d'une alimentation obésogène sur la mémoire. Récemment, nous avons obtenu des résultats très prometteurs sur la prévention de ces déficits de mémoire en imposant aux souris un rythme alimentaire aligné sur les cycles jour/nuit (synchronisation forcée).

Les objectifs sont de relier la nature du régime alimentaire chez le juvénile: i) à ses capacités de mémoire, ii) à la plasticité des synapses dans l'hippocampe et iii) à la régulation de l'activité rythmique de gènes dans l'hippocampe, en basal et lors de la consolidation d'une tâche de mémoire.

Ce projet est innovant et multidisciplinaire.

La REALISATION du projet concerne 4 groupes expérimentaux réparties en 2 cohortes d'animaux transgéniques mâles:

- 1- régime d'alimentation obésogène ad libitum (cohorte 1)
- 2- régime d'alimentation standard contrôle ad libitum (cohorte 1)
- 3- régime d'alimentation obésogène en synchronisation forcée (cohorte 2)
- 4- régime d'alimentation standard contrôle en synchronisation forcée (cohorte 2)

Nous nous attendons à ce que la synchronisation forcée rétablisse au moins en partie ce que le régime d'alimentation obésogène ad libitum perturbe, à savoir la dynamique de connectivité des synapses, la performance comportementale ainsi que la régulation de gènes de plasticité dans l'hippocampe durant la consolidation de mémoire.

Pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous utiliserons deux approches complémentaires : pharmacologique et génétique.

L'objectif final est de mieux comprendre et traiter les problèmes de mémoire chez l'enfant obèse.

L'objet de la présente demande, qui concerne en tout 217 souris génétiquement modifiées, consiste en 3 expériences réparties en 16 groupes d'animaux sur lesquels sont pratiqués 2 procédures expérimentales complémentaires. Celles-ci sont l'injection intrapéritonéale d'agents pharmacologiques et une chirurgie de microscopie intrahippocampale.

Des mesures visant à réduire, remplacer et raffiner les expérimentations ont été mises en place :

- 1) nous utiliserons une souche de souris (C57BL/6) pour laquelle l'influence de la chronobiologie est avérée par nos études préliminaires et pour laquelle l'imagerie de l'hippocampe est possible, évitant ainsi d'utiliser plus d'animaux que nécessaire pour la réalisation des objectifs.
- 2) nous pratiquerons un suivi longitudinal des plusieurs paramètres sur les mêmes souris pour en limiter le nombre tout en gardant la même puissance statistique

Des mesures visant à Réduire, Remplacer et Raffiner les expérimentations seront mises en place : nous combinerons les procédures sur les mêmes souris pour effectuer des analyses multiparamétriques et longitudinales, évitant ainsi d'utiliser plus d'animaux que nécessaire pour la réalisation des objectifs tout en gardant une même puissance statistique. De plus nous avons mis en place des points limites et des grilles d'évaluation de la douleur. Afin de réduire les paliers de douleur modérée prévisibles infligés aux animaux, nous utiliserons un schéma thérapeutique incluant l'utilisation d'anesthésiant local, d'anti-inflammatoire non stéroïdien et de morphinique à faible dose.

13941 *Dermanyssus gallinae* (pou rouge des poules) est un acarien hématophage inféodé aux oiseaux, à prévalence élevée en élevage de poules. Responsable de dégâts directs (stress avec baisse de rendement, déclassement des œufs) et indirects (transmission de salmonelles, allergies chez le personnel), il doit être combattu, mais s'avère largement récalcitrant aux moyens de lutte conventionnels. Ne vivant pas sur l'hôte, il passe l'essentiel de sa vie caché dans des interstices divers, ce qui rend son contrôle délicat. Traiter directement les animaux ne sont pas appropriés. Les traitements le plus souvent préconisés sont appliqués par pulvérisation dans le bâtiment. Ils ne touchent qu'une infime partie de la population et sont souvent d'une efficacité limitée.

Face à l'expansion actuelle de l'acarien et dans un objectif de réduction des intrants de synthèse, le développement de moyens de lutte alternatifs est un enjeu majeur. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet : il vise à développer le contrôle de l'acarien à travers la lutte biologique par conservation. Cela consiste à mettre à profit l'action d'ennemis du bioagresseur naturellement présents dans la zone infestée (ici les bâtiments d'élevage). Le mode de vie distant de l'hôte du pou rouge l'amène à fréquenter des microhabitats où il peut rencontrer divers ennemis naturels (insectes, acariens, et autres arachnides prédateurs, champignons entomopathogènes...). Cela en fait une cible idéale de cette lutte biologique. Nous cherchons pour ce faire à établir les interactions de prédation sur le pou rouge naturellement en œuvre dans ce type de milieu, en plaçant le focus sur les acariens et insectes prédateurs. Nous espérons ainsi à terme pouvoir proposer des amendements pour favoriser l'action des prédateurs.

Du fait des multiples interactions possibles entre ennemis naturels et avec d'autres membres des écosystèmes considérés, il est crucial de raisonner à l'échelle des communautés et non pas seulement des paires proie-prédateur. Afin d'établir les effets des interactions de prédation et de déterminer le potentiel suppresseur de communautés d'acariens et d'insectes, des expérimentations en mésocosmes doivent être menées, en complément d'analyses au laboratoire sur les interactions par paire pou-prédateur. La méthodologie envisagée ici consiste en la mise en contact d'un nombre connu d'acariens ou d'insectes appartenant à différentes espèces à un instant t dans une unité mimant une portion de bâtiment d'élevage (mésocosme) et à recenser les individus de chaque espèce après plusieurs générations du bioagresseur. Cela permettra d'objectiver le potentiel suppresseur en fonction des tailles relatives initiales des populations et de la composition des communautés.

Le principe de ces expérimentations requiert la présence continue de poules pour permettre aux populations de pou rouge de se développer comme dans un bâtiment d'élevage. Aucune manipulation douloureuse n'est pratiquée, exceptée l'application d'un vaccin dans certaines modalités. Le principal désagrément pour l'animal est le confinement durant plusieurs semaines dans un espace de taille réduite. De manière à limiter ce désagrément, des unités aérées mais étanches aux acariens, équipées d'arrivées d'eau et d'aliments, ont été conçues et construites à cet effet au laboratoire. Les animaux seront ainsi autorisés à se mouvoir, boire et s'alimenter ad libitum. Concernant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), nous ne pouvons pas remplacer l'animal (poule), car nous cherchons à mettre en œuvre les interactions trophiques impliquant l'association spécifique entre le pou rouge et son hôte et devons reproduire fidèlement la dynamique des populations de l'acarien hématophage en contexte d'élevage. Le nombre de poules à tester est réduit au minimum (1) en travaillant sur des unités hébergeant une seule poule chacune, (2) en intégrant un nombre de répliquats suffisant pour en tirer des données robustes et éviter de devoir refaire des essais. La dynamique des communautés d'arthropodes en fonction de leur composition et des traitements associés sera établie par comparaison entre les valeurs d'abondance des arthropodes au démarrage et à $T+3$ mois dans chaque unité.

Un total de 640 poules sera utilisé au cours de l'étude. En fin d'expérimentation, les poules seront cédées à titre gratuit, ou, pour celles qui n'auront pas trouvé d'acquéreur, euthanasiées. Nous raffinerons en outre les expérimentations en offrant aux poules la possibilité d'exprimer leur comportement naturel (perchage, grattage). Les poules impliquées dans l'expérimentation ne seront jamais en âge de pondre, si bien que nous ne fournirons pas de zone dédiée à cette activité.

13942 Les infections bactériennes pulmonaires sont responsables de nombreuses pathologies associées à une mortalité majeure. Parmi ces infections, on peut citer la tuberculose (TB) qui est causée par inhalation de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) et qui est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. On retrouve également des pathologies nosocomiales auxquelles sont associées de nombreux pathogènes dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Streptococcus pneumoniae*. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la bactérie elle-même) et de nouveaux vaccins plus efficaces que les vaccins actuels (e. g. le BCG pour la TB) est primordiale afin de lutter contre la pathologie. Notre équipe contribue à ces axes de recherche en étudiant les mécanismes d'interaction entre ces

bactéries pathogènes et l'immunité de l'hôte, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux. Les macrophages alvéolaires jouent un rôle primordial dans la détection des pathogènes pulmonaires, dans la destruction de ces derniers, et dans le recrutement des cellules de l'immunité innée et adaptative. Notre travail a actuellement pour but de disséquer les mécanismes moléculaires régulant les fonctions effectrices des macrophages lors d'infections bactériennes pulmonaires. En particulier, nous étudions le rôle des sucres complexes (ou glycanes) dans la modulation de la réponse des macrophages à l'encontre des bactéries. Avant les études *in vivo* proposées ici, nous avons réalisé plusieurs expériences *in vitro* qui ont démontré que les macrophages humains et murins ont de l'acide polysialique (PolySia), synthétisé par la glycosyltransférase ST8SIA4, à leur surface et sécrètent le PolySia dans le milieu de culture après détection d'une bactérie pathogène. Cependant, l'absence de ST8SIA4 et de PolySia n'a aucun impact sur la réponse antimicrobienne des macrophages (mesure de la survie des bactéries, production des cytokines et du stress oxydative). Nous soupçonnons donc que le PolySia participe au dialogue des macrophages avec les cellules du microenvironnement tissulaire ou avec d'autres cellules immunitaires. Cette hypothèse ne peut être testée qu'en réalisant des expériences dans un modèle murin (souris déficientes ou non pour l'expression de ST8SIA4) reproduisant, notamment au niveau immunologique, de nombreuses observations faites chez l'homme.

Notamment, en utilisant différentes lignées de souris (incluant des souris déficientes pour l'expression de ST8SIA4), nous souhaitons déterminer *in vivo* l'impact de ST8SIA4 et de l'acide polysialique sur la régulation de l'immunité pulmonaire au cours d'une inflammation, induite par des cytokines pro-inflammatoires et au cours d'une infection par des bactéries pathogènes pulmonaires (Mtb, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Streptococcus pneumoniae*). Dans l'ensemble de ces études, les animaux stimulés/infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (survie, charges bactériennes, histologie) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires).

Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 9220 souris se répartissant 3590 souris C57BL/6, 3590 souris C57BL/6 ST8SIA4 KO, 1020 souris RAG2-KO et 1020 souris RAG2/ST8SIA4-DKO. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, les expériences réalisées font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle intégré murin. Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats. De plus, nous avons développé des approches

13943 Les céphalopodes possèdent des capacités cognitives complexes qui génèrent un intérêt croissant autant auprès du public que des scientifiques.

Ce projet permettra d'étudier la capacité des seiches et des poulpes à voyager mentalement dans le temps, afin de revivre des événements de leur passé (mémoire épisodique), de se remémorer les modalités de ces souvenirs (mémoire de la source), ainsi que de se projeter dans leur futur (planification).

Cela nous permettra de développer une compréhension plus fine des liens entre mémoire épisodique et planification du futur, mais également de déterminer, à travers la comparaison de deux espèces de céphalopodes, quelles pressions ont conduit à l'émergence de ces capacités cognitives. En parallèle, afin de mettre en relief les bases cérébrales nécessaires aux voyages mentaux dans le temps, une étude des aires de la mémoire dans le cerveau des céphalopodes sera réalisée.

Ce projet est innovant car il se concentre sur l'étude des voyages mentaux dans le temps, un domaine encore peu développé mais qui attire un intérêt scientifique croissant. De plus, l'étude de la cognition chez les invertébrés est en plein développement, et les céphalopodes font preuve de capacités prometteuses. En effet, la seiche commune a déjà montré une capacité à se remémorer différents aspects d'une expérience passée, ce qui en fait un candidat idéal pour notre projet. Les

poulpes communs sont réputés pour leur ingéniosité, et leur proximité évolutive avec les seiches nous laisse supposer qu'ils présenteront des capacités cognitives similaires.

Pour ce projet, 95 céphalopodes répartis en 50 seiches communes *Sepia officinalis* et 45 poulpes communs *Octopus vulgaris* seront utilisés. Les animaux proviendront des juvéniles nés en captivité (seiches) ou du milieu naturel (seiches et poulpes adultes), et seront élevés et hébergés dans des infrastructures agréées et adaptées. Le nombre d'individus étudiés sera réduit au minimum en réutilisant dans la mesure du possible des individus dans différentes expériences. L'impact négatif de ce projet sur les animaux sera minimisé au maximum en garantissant des conditions d'élevage optimales et en monitorant l'état des animaux de façon journalière afin d'assurer leur bien-être. Durant les expériences, aucune douleur ne sera infligée, aucun stimulus négatif ne sera utilisé et le stress sera réduit à son minimum. Dans un but de raffinement, les tests comportementaux proposés s'approcheront des conditions naturelles, en se basant sur le comportement de prédation envers des proies naturelles et locales. L'euthanasie, quand elle sera nécessaire, soit à cause d'une dégradation de l'état de santé de l'animal ou pour les besoins du projet, sera réalisée après anesthésie, en respectant les procédures internationales recommandées.

Plus en détail, ce projet se composera de 3 études divisées en 7 procédures (P1 à P7). L'étude 1 concernera la mémoire de type épisodique chez les céphalopodes, et sera partagée en 3 procédures : mémoire de type épisodique chez la seiche commune (P1), et le poulpe commun (P2), ainsi que mémoire de la source chez le poulpe commun (P3). L'étude 2 abordera la planification du futur chez la seiche commune (P4) et le poulpe commun (P5). Enfin, l'étude 3 concernera les bases neuronales nécessaires aux voyages mentaux dans le temps chez la seiche commune (P6) et le poulpe commun (P7). Les procédures P1 à P5 étant des tests comportementaux non invasifs et non stressants, une réutilisation des animaux sera possible. Chronologiquement, les seiches seront testées en commençant par la procédure 4, puis 1, puis 6. Les animaux issus de la procédure 4 seront réutilisés dans la mesure du possible dans la procédure 1, et toutes les seiches de la procédure 1 seront utilisées par la procédure 6, limitant ainsi le nombre d'individus utilisés. Les poulpes seront testés en commençant par la procédure 2, puis 3, puis 5, puis 7. Les animaux issus de la procédure 2 seront réutilisés dans la mesure du possible dans la procédure 3 puis dans la procédure 5, et tous les poulpes de la procédure 2 seront utilisés par la procédure 7, ce qui permettra de limiter au maximum le nombre d'individus utilisés.

L'ensemble des tests décrits a été validé par des rapporteurs indépendants et ont conduit à l'obtention d'un financement.

13944 Le fœtus est potentiellement soumis à des situations à risque d'hypoxie (diminution des apports en oxygène au fœtus) et d'acidose (situation à risque pour le fœtus défini par une accumulation du dioxyde de carbone et une baisse de pH) pendant le travail et l'accouchement. La diminution des apports en oxygène pendant le travail peut être à l'origine de séquelles notamment cérébrales. Ainsi l'objectif de la surveillance est donc de repérer et de prévenir ces situations à risque.

Actuellement, la surveillance pendant l'accouchement est assurée par un enregistrement du rythme cardiaque fœtal. L'apparition d'anomalies du rythme cardiaque fœtal peut être corrélée à une hypoxie fœtale. Mais l'analyse de ces anomalies est subjective et peu spécifique de l'acidose. Devant des anomalies de rythme cardiaque fœtal, un recours à des techniques dite de seconde ligne est souvent nécessaire (prélèvement sanguin au scalp du fœtus, pose d'une électrode sur le scalp en continu.). Cependant, ces techniques sont toutes invasives avec nécessité de la rupture de la poche des eaux. La mise au point d'outils d'évaluation de l'hypoxie fœtale, objectifs et par une méthode non invasive est donc essentielle. Le but de notre étude est de valider un nouveau modèle de surveillance du fœtus pendant le travail. Cet outil évalue l'inconfort fœtal par l'analyse de la variabilité du rythme cardiaque fœtal.

Ce travail expérimental est le prérequis indispensable à une utilisation de notre outil d'évaluation de la variabilité du rythme cardiaque chez le fœtus humain.

La variabilité du rythme cardiaque fœtale est le reflet de l'activité du système nerveux autonome, mis en jeu dans le bien être fœtal, et peut être calculée à partir d'un signal électrocardiogramme.

Notre système d'enregistrement de la variabilité du rythme cardiaque permet l'analyse de celle-ci par le calcul d'un indice. La finalité de ces travaux serait l'application en pratique clinique comme élément de surveillance non invasive, continue et objective de deuxième ligne pendant le travail, pour confirmer ou non un réel état de stress fœtal.

Cependant, avant de pouvoir l'appliquer à des situations pathologiques pendant le travail, il est nécessaire de déterminer quelles vont être la corrélation entre notre nouvel outil et l'état fœtal. Il n'existe pas, à notre connaissance, de méthode de substitution à un modèle animal pour étudier la réponse due à une modification des paramètres hémodynamiques lors de la vie intra-utérine. Nous avons donc choisi comme modèle la brebis, espèce mammifère dont la grossesse possède de nombreuses similitudes avec la grossesse chez l'Homme et notamment un poids du fœtus agneau proche du poids d'un nouveau-né humain.

En conclusion, ce travail expérimental est le prérequis indispensable à une utilisation de notre outil d'évaluation de la variabilité du rythme cardiaque chez le fœtus humain.

Cent animaux (50 brebis gestantes et leurs 50 fœtus) seront concernés, soit environ 10 brebis par an.

Après une semaine d'acclimatation aux locaux de l'animalerie, nous créerons notre modèle chirurgical et débuterons le protocole. Une manipulation par jour sera réalisée et nous évaluerons la réponse du fœtus par compressions répétées du cordon ombilical grâce à un occluteur mimant les contractions utérines pendant le travail chez l'Humain. A la fin du protocole, les brebis seront maintenues vivantes à chaque fois que possible.

Le protocole respectera la règle des "3R" en limitant le nombre d'animaux, en prenant en compte leur douleur et l'angoisse infligées par l'expérimentation, mais aussi leur confort dans l'animalerie.

13945 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (1/3500 naissances mâles). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X et résulte d'une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché. La thérapie génique fait partie des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie chez l'homme ou pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire.

La DMD est en général causée par une perturbation du cadre de lecture du gène de la dystrophine à l'origine d'une perte de fonctionnalité de la protéine dystrophine. Le cadre de lecture peut être restauré par la mise en œuvre d'une stratégie de saut d'exon médiée par des oligonucléotides antisens (AON) permettant la production d'une protéine délétée au sein de sa structure interne mais partiellement fonctionnelle à l'image de la protéine dystrophine que l'on retrouve dans la dystrophie musculaire de Becker moins sévère que la DMD. Cependant, en raison de la variation génétique existante entre espèces, la possibilité d'utilisation de modèles murins présentant des mutations dans les gènes murins est limitée pour tester et optimiser les AON spécifiques à l'homme *in vivo*. Pour résoudre ce problème, une équipe de recherche a récemment généré la souris *del52hDMD/mdx*. Ce modèle porte à la fois les gènes de la DMD murine et humaine. Cependant, dans ce modèle, l'expression de la dystrophine murine est supprimée en raison d'une mutation "stop" au niveau de l'exon 23, tandis que l'expression de la dystrophine humaine est abolie en raison de la suppression de l'exon 52. Le modèle *del52hDMD/mdx*, comme la souris *mdx*, montre des signes de dystrophie musculaire au niveau histologique et une déficience fonctionnelle légère au niveau phénotypique.

Notre projet vise à maintenir une colonie de souris *mdx-hDMDdel52* à partir de mâles et de femelles homozygotes (et éventuellement hémizygotés). Les souris *mdx-hDMDdel52* générées seront destinés à poursuivre le programme de reproduction ou à être incluses dans des études futures de thérapie génique et notamment des études mettant œuvre les stratégies de saut d'exon médiées par des AON.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit :

- Réduction :

La détermination du nombre total d'animaux à inclure dans ce programme de reproduction a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience de précédentes reproductions menées pour des projets de thérapie génique chez le rat DMDmdx. Dans ce projet, afin de générer au maximum 200 souris mdx-hDMDdel52 par an, nous estimons qu'il sera nécessaire de mettre à la reproduction environ 20 femelles et 10 mâles par an, soit un total de 150 animaux reproducteurs utilisés sur 5 ans afin de générer environ 1000 petits maximum. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances théoriques sur les particularités de reproduction sur ce modèle et en considérant que la lignée générera des portées de taille standard.

- Raffinement :

Le bien-être animal passera notamment par :

1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu (cages équipées de mezzanine et mise à disposition d'éléments d'enrichissement comme des carrés de coton, des tunnels en carton, des sizzle dry (papier) et des morceaux de bois).

2) un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)

3) l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou autre, ou euthanasie si pas d'autre alternative)

4) Afin d'améliorer la réactivité du personnel animalier, une grille de scoring de la douleur sera mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates (Cf. exemple annexe de la saisine).

5) la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions éventuelles (anesthésie et analgésie si nécessaire).

- Remplacement : la développement d'une colonie de souris mdx-hDMDdel52 permettra notamment d'étudier les stratégies de saut d'exon médiées par des oligonucléotides antisens spécifiques à l'homme *in vivo* dans le cadre de la recherche thérapeutique pour la dystrophie musculaire de Duchenne. Le remplacement d'animaux n'est pas encore possible dans ce type d'étude (ou du moins pas totalement), car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique *in vivo*. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le mode d'administration utilisé et la dose administrée.

13946 Le diabète de type 2 (DT2) est une cause majeure de mortalité précoce et d'invalidité dans le monde. Le régime alimentaire occidental contribue largement à l'augmentation de l'obésité, qui se caractérise par une surconsommation d'aliments enrichis en sucres, en sel et en graisses saturées, qui avec le temps exacerbe toutes les maladies chroniques de notre société. Dans le DT2, les reins jouent un rôle en réabsorbant les substrats en excès que sont glucose, fructose et mannose (via le transporteur *sGLT4*), augmentant ainsi l'hyperglycémie. Des données préliminaires montrent que ce transporteur *SGLT4* est présent dans le pancréas (îlots de Langerhans). De plus, les taux d'ARNm *SGLT4* ont été observés dans les îlots de Langerhans des patients atteints de DT2 par rapport aux îlots provenant d'individus sains. Il s'agit là d'une découverte importante, car la sécrétion d'insuline induite par le mannose pourrait déclencher un dysfonctionnement prématuré des cellules bêta ou une résistance à l'insuline.

Dans ce travail, nous visons à étudier la localisation détaillée de *SGLT4* et à étudier le mécanisme de l'impact du mannose sur la sécrétion et la régulation des hormones pancréatiques de manière dépendante de *SGLT4*. L'objectif final est de vérifier si la perte de fonction du *SGLT4* a un impact bénéfique sur la régulation hormonale et la régulation de la glycémie et, par conséquent, si elle comporte un potentiel pour de futures stratégies de traitement des patients diabétiques.

Comme il s'agit d'effets systémiques, nous ne pouvons pas utiliser d'approches *in vitro* (lignées cellulaires) pour cette étude (Remplacement). Cependant, nous réduisons le nombre d'animaux au maximum (400 souris sur 5 ans) et utilisons des expériences de faible gravité

(Réduction/Raffinement). Toutes les souris utilisées dans cette étude sont maintenues dans un cycle de 12h clair et 12h sombre avec libre accès à la nourriture et à l'eau. Les expériences sur les animaux sont réalisées conformément aux réglementations institutionnelles et nationales par des personnes qualifiées. Tous les tests sur les animaux sont effectués dans une pièce séparée de la zone d'hébergement et dans des conditions respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

13947 Le cancer du sein est le plus courant des cancers et une cause importante de décès chez les femmes à travers le monde. La mortalité associée à ce type de cancer est majoritairement due à la formation de métastases dans les organes périphériques. Pour augmenter l'efficacité des traitements il est donc important de continuer à comprendre comment les métastases se forment à partir des tumeurs primaires mammaires pour définir de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'en empêcher la formation.

Nous essayons de comprendre si un stress lié à l'altération du rythme jour/nuit, peut influencer sur l'apparition et le réveil des cellules souches cancéreuses. Il existe en effet dans chaque organisme une horloge moléculaire, régulée par le cerveau, capable d'adapter l'activité de nos organes et notre métabolisme à cette alternance des jours et des nuits. Des altérations de cette horloge moléculaire sont associées à l'apparition de lésions cancéreuses chez les personnes travaillant en horaire décalé mais pourraient aussi avoir un rôle sur la dissémination des cellules cancéreuses et sur leur aptitude à former des métastases.

Nos études sur des cellules en culture ont montré que les cellules cancéreuses de sein ne se comportent pas de la même manière en fonction des phases du rythme circadien, une phase du cycle (correspondant à la phase nocturne) favorisant la migration des cellules cancéreuses et leurs propriétés souches et invasives. La perturbation du rythme circadien dans ces cellules peut ainsi modifier leurs propriétés et leurs aptitudes à migrer et former des métastases.

Suite à ces études *in vitro*, nous avons validé nos résultats chez l'animal, en provoquant un stress circadien réel par l'utilisation de jet lag répétés. Nous utilisons pour cela une lignée de souris transgéniques développant spontanément des tumeurs mammaires (MMTV-PyMT). Au début de l'expérimentation, les souris sont soumises soit à une alternance jour/nuit normale (12h pour chaque période) soit à une alternance jour/nuit variable (jetlag) pour une durée définie.

Afin de mesurer l'effet du jet lag sur l'horloge circadienne des souris, il est nécessaire de mesurer l'activité des souris. Ceci se fait grâce à une étude de télémétrie qui mesure, en temps réel, la température corporelle et l'activité des souris. Dans le cas contrôle, l'activité des souris est essentiellement nocturne et ces dernières se reposent le jour. Par contre, sous l'effet d'un jetlag chronique, l'activité des souris ne suit plus l'alternance des jours et des nuits. C'est ce que nous voulons vérifier avec ce projet lorsque les souris développent un cancer mammaire.

Notre projet prend en considération la règle des 3Rs:

Remplacer: La majeure partie de nos expérimentations sont réalisées *in vitro* sur des cultures cellulaires. Cependant la reproduction d'un stress circadien et de ses répercussions sur l'organisme ne peut pas être réalisée *in vitro*, tout comme le contexte biologique de la progression tumorale. Le recours à l'animal est donc nécessaire pour valider l'effet d'un stress circadien sur la progression tumorale.

Réduire: nous avons défini nos plans d'expériences afin d'avoir un nombre d'animaux par lot (6) permettant de réaliser des analyses statistiques discriminantes entre lots contrôles et lot expérimentaux. Le nombre total d'animaux pour cette expérimentation est de 36 souris.

Raffiner: les animaux seront hébergés dans une animalerie agréée et manipulés par des personnes formées. Les cages comprendront des éléments pour enrichir l'environnement des animaux et leur permettre de reproduire des comportements naturels (exploration, fouissement, nidification). Les animaux disposeront de nourriture et d'eau ad libitum et seront visités quotidiennement afin d'évaluer leur état de santé et leur comportement. Un traitement analgésique par injection sera appliqué à l'apparition des symptômes suivants : perte d'appétit, poil hérissé et terne, problème de motricité. Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'expérimentation ou lorsque l'un des points limites définis dans le projet sera franchi.

13948 L'un de nos partenaires dispose d'une technologie permettant de générer des cellules de tissu adipeux brun à partir de cellules souches d'origine humaine. Nous souhaitons mettre en place un modèle animal permettant d'étudier les capacités de ces cellules afin de pouvoir étudier l'importance de ce tissu dans les fonctions régulatrices du métabolisme. Ce modèle pourrait offrir de nombreuses possibilités analyses des voies métaboliques de ce type de tissu adipeux. Les résultats obtenus pourraient ensuite être exploités dans le cadre de la recherche sur les pathologies liées à l'obésité ou plus généralement au métabolisme chez l'Homme.

Dans un premier temps, nous souhaitons donc développer ce modèle chez la Souris et donc greffer des cellules au sein d'animaux génétiquement modifiés au niveau du système immunitaire afin d'éviter les rejets.

Pour cela, nous prévoyons d'employer 3 groupes de 6 souris, soit un total de 18 souris qui recevront des greffes de cellules au niveau sous-cutané par une injection pratiquée à l'aide d'une aiguille fine. Les groupes expérimentaux seront dépendants du lieu d'injection et du médium d'injection. Deux semaines après cette injection, les souris recevront une injection d'un produit spécifique (isoproterenol) qui a la propriété d'activer le tissu adipeux brun. Nous chercherons alors à visualiser l'activité des cellules greffées à l'aide d'une caméra thermique. Ce protocole constitue une approche classiquement employée.

Cette analyse pourra être répétée une seconde fois après 2 semaines si les résultats ne sont pas significatifs.

- Remplacement: Ce protocole consiste à mettre en place un modèle animal pour permettre de poursuivre le développement de cet outil de recherche que constitue la cellule souche. Le modèle animal viendra compléter la batterie d'outils à disposition.

- réduction: Etant donné le caractère exploratoire de ce projet, nous avons limité le nombre d'animaux à 6 par groupe, soit un total de 18 souris. Cet effectif permettra d'obtenir suffisamment d'informations pour déterminer si la méthodologie employée peut permettre d'établir un futur modèle d'étude. Au préalable, une étude de validation des anesthésiques requerra 15 souris. Un total de 33 souris seront donc employées dans ce projet.

- raffinement: Durant l'ensemble du protocole, toutes les précautions seront prises pour réduire les risques de souffrance des animaux. La lignée employée étant immuno-déprimée, un protocole très strict sera employé pour manipuler les animaux et changer leurs cages afin d'éviter une contamination. Les données disponibles sur ces animaux nous ont confirmé qu'ils ne présentaient pas de risque d'inflammation ou de lésion lors d'injection et qu'ils n'avaient pas de fragilité marquée dans le cadre de protocole à long terme. Les conditions d'hébergements suivront toutes les recommandations actuelles, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau, un enrichissement de l'environnement. Lors des procédures expérimentales, les animaux seront anesthésiés et maintenus à température à l'aide d'une couverture thermo régulée. Les souris seront observées quotidiennement et en cas de réaction locale, un protocole de soin sera mis en place avec la structure du bien-être animal et le vétérinaire. L'animal sera retiré de l'étude si une lésion se présente au site de l'injection.

13949 Les dispositifs médicaux (DM) prennent une place grandissante dans notre pratique de la médecine et de la chirurgie.

Ces dispositifs correspondent à tout instrument, implant, appareil, équipement, logiciel ou réactif utilisé, seul ou en association, à des fins médicales chez l'homme.

De nature et d'application très variées, les DM basés sur des approches mini invasives connaissent un développement croissant et répondent aux défis de l'innovation et des nouvelles technologies dans la prise en charge des patients. Il peut s'agir par exemple d'endoprothèses vasculaires, de stents digestifs permettant l'anastomose de compartiments, le drainage de collections, le traitement de tumeurs, de logiciels accompagnant la navigation per opératoire..... De nouveaux instruments sont aussi en cours de développement pour améliorer la pratique de la chirurgie mini-invasive, en laparoscopie ou par voie percutanée par exemple.

Pour permettre leur application en clinique, le développement de nouveaux DM s'appuie sur des phases de validation préclinique où la faisabilité, l'efficacité et la sécurité des équipements doivent être démontrées.

Cette évaluation préclinique passe par des essais permettant (i) la preuve de concept et la mise au point des techniques chirurgicales qui se veulent les moins invasives possibles, et (ii) la vérification que le dispositif est efficace et fiable pour l'indication thérapeutique visée.

Le but de ce projet est de tester sur modèle porcin de nouveaux dispositifs chirurgicaux implantés et médicaux innovants pour en étudier et tester l'efficacité, la compatibilité, la fiabilité et la sécurité. 350 animaux pourront être utilisés sur 5 ans dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacement : Toute évaluation d'un dispositif médical doit apporter un faisceau de preuves suffisant de son efficacité et de sa sécurité pour autoriser son utilisation sur des patients avec un taux de réussite optimal (durée d'intervention, efficacité du geste). L'étude initiale du DM sur simulateurs et modèles *ex vivo* permet d'en tester le concept et la faisabilité technique. Elle doit être souvent complétée par des études de compatibilité, d'efficacité et de sécurité qui nécessitent une phase d'expérimentation sur organisme entier vivant. Les procédures innovantes sont ainsi reproduites dans des conditions proches de la clinique, précliniques, qui incluent également les situations parfois difficiles liées aux voies d'abord, repères anatomiques, hémorragie, nécrose, viabilité des organes, complications.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables permettant d'envisager une application chez l'homme. Les interventions sont réalisées par des chirurgiens experts, ce qui limite le nombre d'animaux nécessaires en optimisant le taux de succès. Chaque DM sera testé préalablement sur un faible effectif d'animaux (2 à 6) avant d'engager une étude plus complète après avis d'experts et d'éventuelles améliorations du dispositif et/ou de la procédure.

Raffinement :

Le protocole prévoit des procédures mini-invasives réalisées sous anesthésie générale. Dans les études de faisabilité, de nombreux DM peuvent être évalués sans nécessité de réveiller l'animal en fin d'expérimentation.

Dans les études de compatibilité, d'efficacité et de sécurité du DM, les animaux seront réveillés après l'intervention et seront soumis à un suivi clinique quotidien par du personnel qualifié, sous couverture antalgique dès que nécessaire, et hébergés dans un environnement contrôlé (température, hygrométrie) et enrichi: Les porcs sont des animaux sociaux, propres, avec un instinct de fouissement et d'exploration des matériaux. L'enrichissement apporté pour favoriser leurs comportements naturels comprend une stabulation en groupe social, la mise à disposition de jouets à mâchouiller, à manipuler (balles, jouets, chainettes), l'accès à des zones de repos distinctes des zones de défécation. L'environnement sonore en animalerie est aussi apaisé par la diffusion de musique.

Toute altération de leur état général sera reportée au vétérinaire et au responsable de l'intervention médicale qui mettront en œuvre des traitements adaptés. Des critères d'arrêt anticipé en cas de survenue de complications sont définis et validés par la structure en charge du bien-être animal.

13950 Les anticorps monoclonaux (AcM) sont des outils biologiques avec plusieurs applications dans les traitements, le diagnostic et la recherche. Ils sont fabriqués chez certains animaux (souris, rat, lapin) par un procédé technique particulier.

L'animal est d'abord immunisé pour produire les anticorps, puis, euthanasié et les cellules productrices d'Ac sont prélevées et fusionnées avec des cellules partenaires afin d'immortaliser ces cellules.

Nous travaillons sur les récepteurs de l'immunité innée et leurs molécules associées. Une de ces molécules est appelé MD-2 (Myeloïd Differentiation factor-2). C'est un élément du complexe du récepteur TLR4. Elle existe sous deux isoformes: une longue (22Kda) et une courte (18Kda). Il

n'existe pas aujourd'hui d'anticorps capable de distinguer les deux isoformes. Quant aux TLR4 (Toll-like receptors), il n'existe pas d'Ac capable de stimuler directement ce récepteur. C'est pour ces raisons que nous envisageons de produire des AcM spécifiques et d'étudier leur rôle afin de les utiliser dans les différentes applications citées ci-dessus.

Notre projet à deux objectifs : le premier est la production des AcM contre la molécule MD2 et le récepteur TLR4 et le second est l'étude de leur rôle dans la réponse immunitaire.

Pour la première partie : la molécule concernée ou les peptides lui correspondant seront injectées à des souris BALB/C femelles adultes de 8 semaines. Des groupes de 3 souris seront constitués. Pour l'ensemble de ces expérimentations nous utiliserons 33 souris (18 pour l'immunisation et 15 pour le clonage). La réponse immunitaire sera contrôlée et la souris qui aura bien répondu sera euthanasiée et la rate prélevée et fusionnée avec les cellules partenaires. (Voir table 2 en annexe).

Pour l'étude des rôles des AcM obtenus, l'étude sera faite au départ *in vitro* sur des lignées cellulaires, les AcM sélectionnés seront alors testés *in vivo* pour leur rôle différent sur la réponse immunitaire.

1) -Les Acs activateurs de la réponse immunitaire. Nous prévoyons de tester au moins 2 anticorps obtenus, pour chaque Ac nous constituerons sept groupes de souris BALB/C femelles adultes avec trois souris par groupe. Nous testerons la réponse immunitaire contre la sérum albumine bovine (BSA) (g1°, contre la BSA associée à l'adjuvant(g2), contre la BSA associée à l'Ac à 3 doses différentes (g 3,4,5), contre la BSA associée avec un AcM contrôle (g6)(le même isotype mais de spécificité différente), et contre un contrôle négatif (g7) (immunisation par solution physiologique). Les sérums de souris seront ensuite prélevés pour évaluer la réponse Ac. Les souris seront euthanasiées et les organes prélevés pour l'analyse profonde de la réponse. Pour cette partie de l'étude nous utiliserons donc 42 souris BALB/C (8semaines). (Voir tables 3 et 4)

2) -Les Acs inhibiteurs de la réponse immunitaire: Il faudra travailler chez la souris auto-immune (F1- NZB-NZW), femelle de 4 semaines d'âge. Ici on prévoit au moins 4 Acs à tester. Pour chaque Ac, Il aura 8 groupes des souris avec 3 souris par groupe. Un groupe traité par l'Ac (3 groupes pour 3 doses d'Ac), un autre groupe traité par un Ac contrôle" anticorps de même isotype qui ne reconnaît pas l'antigène" (3 groupes pour 3 doses), un groupe avec la solution physiologique et un dernier groupe sans traitement. Pour mener à bien cette expérience nous devons faire appel à 96 souris. Les sérums des souris seront prélevés et testés pour suivre les marqueurs biologiques. Les souris seront euthanasiées et les organes prélevés pour l'étude cellulaire et l'évaluation de l'état des tissus. (Voir tables 5 et 6)

En résumé, nous aurons besoin pour mener à bien ce projet de 5 ans : de 75 souris femelles adultes BALB/C (8 semaines) et de 96 souris femelles F1- NZB-NZW (4 semaines). Le raffinement et les méthodes expérimentales pour réduire au maximum la souffrance animale sera mise en œuvre en utilisant les points limites clairement établis. L'ensemble des expériences est mené par des personnels qualifiés, dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur (enrichissement des cages). Les animaux seront inspectés quotidiennement (changement du comportement, fatigue, difficulté du mouvement) et l'utilisation d'analgésique se fera en cas de besoin (En ce qui concerne l'analgésie, nous utiliserons un AINS le méloxicam (Métacam 1. 5 mg/ml siropND) à la dose de 0. 025ml pour 100 grammes de souris toutes les 24 heures si nécessaires. Le bien-être animal sera donc suivi tout au long de l'étude. (voir tables 1)

13951 L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie caractérisée par une pression anormalement élevée du sang dans les vaisseaux sanguins (Pression artérielle systolique (PAS) ≥ 140 mmHg et/ou pression artérielle diastolique (PAD) ≥ 90 mmHg). Dans l'immense majorité des cas, l'HTA est dite essentielle car aucune cause connue ne peut expliquer son apparition. Néanmoins, elle peut être secondaire à d'autres maladies cardiovasculaires et/ou métaboliques ou à des traitements médicamenteux. Par exemple, l'HTA est fréquemment associée au diabète, environ 50 % des diabétiques ont une HTA déclarée, constituant un facteur aggravant de toutes les complications. Dans le monde, plus d'un adulte sur trois souffre d'HTA et c'est la maladie chronique la plus

fréquente en France. En absence de traitement, l'HTA peut entraîner des complications graves au niveau cardiovasculaire, cérébrovasculaire ou au niveau de certains organes cibles (rein, rétine ...), c'est la première cause évitable d'accident vasculaire.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'effet de nouveaux composés sur la pression artérielle (PA). Soit, dans le but d'analyser leur efficacité sur le traitement de l'HTA et de compléter ainsi l'arsenal thérapeutique disponible actuellement. Soit, afin de s'assurer de l'absence d'effet indésirable sur la PA d'un nouveau produit dédié à d'autres indications thérapeutiques.

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire dans ce contexte car aucun modèle *in vitro* ne permet d'étudier cette pathologie (remplacement) dont l'apparition est la résultante de la dérégulation de plusieurs mécanismes physiologiques.

Les effets des composés sont donc évalués en fonction de l'objectif de l'étude, soit sur un animal présentant des maladies cardiovasculaires et/ou métaboliques représentatif de la pathologie humaine (rat hypertendu et/ou diabétique) pour analyser une efficacité ; soit sur un animal normotendu pour s'assurer de l'innocuité. Les composés à tester sont administrés chez l'animal et la PA est mesurée par la suite chez l'animal éveillé pour l'évaluation de leurs effets. La mesure de la PA se fait après l'installation d'un cathéter dans une artère (carotide ou fémorale) afin d'y brancher un capteur de pression, permettant d'effectuer des mesures répétées chez l'animal éveillé. Les composés qui seront analysés ont préalablement été étudiés *in vitro* et dont la cible thérapeutique suggère un effet sur la PA (réduction). Du fait des connaissances des procédures liées au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire au minimum (réduction) le nombre d'animaux inclus dans un groupe de traitement à n=12 pour réaliser des statistiques acceptables, soit un nombre total de rats de n=600 pour l'intégralité du projet sur 5 ans.

Les protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales seront suivis assidûment. Ensuite, un suivi quotidien de l'état général et du poids de l'animal sera réalisé dès la mise en place d'un traitement, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. Enfin, les rats seront hébergés par 2 par cage dès que possible et tant que le protocole le permet afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress, et un enrichissement adapté à leur espèce sera mis en place systématiquement (raffinement). Afin de compléter les données, des analyses biochimiques, de biologie moléculaire et histologique pourront être réalisées *ex vivo* à partir de sang, recueil d'urine ou d'organes prélevés chez les animaux.

13952 La découverte de nouvelles biomolécules, de même que le développement de nouveaux nanomatériaux, sont utiles pour des applications aussi variées que la mise au point de nouveaux médicaments ou de composants électroniques innovants, et nécessite une évaluation critique de leurs effets en santé humaine.

L'organisme humain, de même que celui des animaux, possède des barrières de protection naturelles très efficaces limitant les contaminations par la plupart des produits de l'activité humaine. Certains composés, de par leurs propriétés intrinsèques, peuvent cependant franchir ces barrières physiologiques et avoir un impact sur la santé humaine. Selon le mode d'exposition à ces produits, on peut être amené à étudier différents scénarios. Ainsi, en cas de contamination par voie aérienne, il est impératif de vérifier si des produits déposés dans les poumons pourront ou non franchir la barrière air/sang, ce qui entraînerait une contamination secondaire de tous les organes. Ce domaine concerne particulièrement les nanomatériaux qui, produits en très grande quantité et compte tenu de leur taille nanométrique, peuvent se retrouver en suspension dans l'air que nous respirons et donc s'accumuler dans nos poumons. D'autres barrières physiologiques sont en jeu dans le domaine du médicament, car le mode d'exposition repose très souvent soit sur une prise orale soit sur une injection intravasculaire. Dans le premier cas, le produit doit d'abord passer la barrière intestinale pour circuler dans le sang. Une fois dans la circulation sanguine, le médicament pourra potentiellement franchir différentes barrières, telles que la barrière hémato-encéphalique (protégeant le cerveau), la barrière materno-fœtale chez la femme enceinte ou bien les barrières épithéliales protégeant les organes.

L'évaluation du passage des barrières physiologiques par des biomolécules ou des nanomatériaux repose sur des études de biodistribution, combinant le marquage radioactif des composés étudiés à des études de radioimagerie de coupes d'organes. Aucun dispositif *in vitro* ou informatique ne peut reproduire un organisme entier, avec les différentes barrières à la diffusion des produits étudiés. Ces études impliquent donc l'exposition d'animaux vivants à des composés radiomarqués (3H ou 14C), par différentes voies (aérienne, orale ou intraveineuse). Des mesures de radioactivité dans tous les tissus/organes de l'animal permettront de quantifier la présence du produit utilisé.

Lors de cette approche expérimentale, trois projets distincts seront réalisés :

- Le projet Vecteurs Peptidiques concerne la capacité de certains vecteurs peptidiques à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), après injection intravasculaire. Ces vecteurs peuvent faire passer la BHE à de nombreux médicaments (80% des médicaments ne traversent pas cette barrière seuls). La conjugaison du vecteur à un médicament ouvre ainsi la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour de nombreuses pathologies affectant le cerveau chez l'homme. Outre le passage de barrière, la biodistribution de ces vecteurs et de leurs médicaments conjugués devra être établie, afin de valider leur intérêt thérapeutique.
- Le projet Imines Cycliques concerne l'étude des imines cycliques produits par des dinoflagellés, des microorganismes marins s'accumulant dans la plupart des fruits de mer. Les molécules organiques de petites tailles, comme les imines cycliques, peuvent avoir un impact en santé humaine en raison de leur capacité potentielle à passer des barrières physiologiques, notamment celle de l'intestin.
- Le projet Nanomatériaux concerne la capacité à passer la barrière air/sang des nanotubes de carbone et du graphène, après une exposition pulmonaire de l'animal. Ces nanomatériaux aux propriétés exceptionnelles font l'objet d'un développement intense dans la plupart des pays industrialisés et sont ainsi produits en très grande quantité.

Les 3 projets, menés sur 5 ans, prévoient le recours à environ 1200 rongeurs nés et élevés à cette fin dans des établissements autorisés. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Bien que les méthodes expérimentales aient été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre, l'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie, garantira leur bien-être. Leur état de santé sera surveillé tout au long du projet, ce qui permettra au vétérinaire de l'installation d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

13953 L'aquaculture représente une alternative aux prélèvements de poissons sauvages dans la nature pour l'alimentation humaine. Le grand nombre d'animaux présents dans les élevages constitue un contexte favorable au développement de maladies infectieuses bactériennes ou virales, souvent dévastatrices. La carpe est l'espèce la plus importante en masse pour la pisciculture à l'échelle mondiale.

Pour améliorer les conditions d'élevage des animaux, diminuer ou annuler l'impact des maladies et contribuer à rendre l'aquaculture plus « durable », le développement de vaccins et la sélection d'animaux naturellement plus résistants constituent les deux approches majeures.

Nos projets de recherche visent à mieux comprendre les mécanismes de défense des poissons contre leurs pathogènes pour optimiser la protection assurée par des vaccins contre des virus pour lesquels ils ne sont pas encore disponibles ou pas parfaitement efficaces. Les poissons sujets à infection expérimentale et/ou immunisation sont analysés par différentes approches immunologiques et moléculaires.

Les lignées cellulaires (*in vitro*) sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants. Nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées. Nous effectuons les expériences dans un environnement optimal pour les animaux. Les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels

les poissons se frottent: même lorsqu'ils ne se blessent pas ce faisant, l'intégrité du mucus est souvent altérée ce qui fragilise l'animal.

Nous prévoyons d'utiliser au total 1900 poissons pour ce projet. Sur de jeunes carpes (2 à 10 g, âgées de 3 à 6 mois), on effectue des immunisations expérimentales pour étudier la réponse à l'immunisation et pour tester la protection induite par cette réponse. Le projet comprend 3 procédures : immunisation par bain ou par injection (procédure 1), puis mesure de la protection des animaux immunisés, par infection expérimentale par bain (procédure 2) ou par injection (procédure 3). Les modalités de la réponse sont analysées sur des tissus prélevés post-mortem ou sur le sérum.

Les animaux sont gardés le temps que la réponse non spécifique induite par l'immunisation soit très atténuée, c'est à dire entre 2 et 6 mois selon les protocoles. Les groupes sont de 10 animaux pour effectuer des prélèvements ou de 30 pour évaluer l'efficacité de l'immunisation par infection expérimentale. Les expériences d'infection expérimentale durent de 3 à 6 semaines.

Tous les gestes techniques comme les injections, les prélèvements sanguins et de mucus se feront sur animaux anesthésiés. Les prélèvements de tissus sont faits post-mortem.

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être mis en œuvre dans des modèles *in vitro*, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponses aux infections sont à l'échelle de l'individu, et dans une dynamique temporelle de quelques semaines à quelques mois.

13954 Ce projet consiste en une étude comparative des bases comportementales et cérébrales du traitement des vocalisations conspécifiques (voix) chez 3 espèces de primates : l'humain, le macaque rhésus et le marmouset commun. Ces trois espèces ont en effet une communication vocale riche et des résultats récents mais fragmentaires suggèrent la présence de « patchs vocaux » dans leur cerveau: des régions corticales montrant une activité particulièrement élevée en réponse à la voix d'un individu de la même espèce.

Le projet a pour but: (1) de comparer les trois espèces au moyen de tests comportementaux similaires via des systèmes de tests automatisés accessibles à volonté par les singes ; (2) d'utiliser pour comparer les réponses cérébrales à la voix l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), une technique de neuroimagerie non-invasive pouvant être utilisée de manière comparable chez les trois espèces. Nous testerons en particulier l'hypothèse de l'existence d'un système de patchs vocaux, fortement conservé chez les primates comme c'est le cas pour les « patchs de visages » du cortex visuel, et dont nous examinerons en détail les similarités et différences entre espèces. Nous espérons que les résultats obtenus fourniront des informations précieuses sur l'évolution récente de la perception de la voix chez les primates et son rôle potentiel dans l'émergence de la parole et du langage humains.

La partie du projet présentée ici concerne les expériences réalisées chez le singe rhésus. Les expériences seront effectuées sur un groupe de 12 jeunes adultes (11 femelles, 1 mâle) hébergés ensemble dans une grande volière enrichie, permettant des interactions sociales complexes. Ils seront soumis à des tests de perception de la voix via des systèmes de test automatiques accessibles à volonté depuis leur volière et leur délivrant des petites récompenses alimentaires. Pour l'IRMf, les sujets seront implantés chirurgicalement avec un plot de tête, avec analgésie pendant la chirurgie et la phase de récupération, placée sous suivi vétérinaire. Une fois la récupération effectuée ils seront entraînés à rester immobile dans leur chaise dans un faux scanner, en sessions de travail quotidiennes constituées d'étapes d'habituation progressives afin de minimiser le stress de l'animal. Pour l'imagerie proprement dite les individus seront transportés et hébergés par paires dans un espace de stabulation temporaire proche du scanner, pour des campagnes d'imagerie quotidienne de deux semaines, puis retournés à leur groupe. 3Rs

Remplacement. Il s'agit d'une étude comparative entre l'humain et d'autres espèces. Il est donc inévitable pour ce projet d'avoir recours aux animaux. Nous examinons différentes espèces de primates afin de reconstituer l'évolution relativement récente (< 35 millions d'années) de la perception de la voix.

Réduction. Il est prévu d'étudier un groupe de 12 singes rhésus. Ils seront logés ensemble dans une grande volière (~50 m²) permettant des interactions sociales riches favorisant le bien être du groupe et une meilleure survie des nouveaux nés. Cette taille de groupe permettra d'accumuler un grand nombre d'essais aux tests comportementaux. Il rend aussi possible une comparaison aux données IRM fonctionnelle humaines sur la base de groupes de sujets de taille comparable. Il s'agit d'un aspect crucial de cette étude comparative, essentiel pour obtenir une évaluation de la variabilité interindividuelle à travers les espèces, notamment celle de la latéralisation cérébrale des patchs vocaux.

Raffinement. Les procédures envisagées sont de classe légère à modérée, notamment de par l'accès volontaire aux tests comportementaux, et de par l'utilisation d'une technique d'imagerie peu invasive, après entraînement intensif dans un faux scanner afin de diminuer le stress de l'animal. La pose du plot de tête s'effectuera sous anesthésie et analgésie après prémédication afin d'éviter au maximum tout stress ou douleur pour le sujet.

13955 L'importance de l'infarctus du myocarde et ses conséquences en termes d'insuffisance cardiaque et de mortalité cardio-vasculaire en font un problème de santé publique majeur dans les pays développés.

La taille de l'infarctus est le facteur majeur du pronostic après infarctus du myocarde aigu. Les interventions visant à réduire la taille finale de l'infarctus ont donc un intérêt clinique majeur pour améliorer le pronostic des patients pris en charge pour infarctus du myocarde. La prise en charge actuelle de l'infarctus du myocarde vise à reperfuser le myocarde le plus rapidement possible, par angioplastie coronaire percutanée primaire le plus souvent. Cependant des études expérimentales et cliniques ont montré qu'une reperfusion brutale avait aussi des effets délétères sur le myocarde ischémique et induisait des lésions de reperfusion supplémentaires. Ces dommages survenant après reperfusion peuvent participer jusqu'à 40% de la taille finale de l'infarctus.

Dans ce contexte, l'objectif du projet de recherche d'une durée de trois ans, est de 1) proposer de nouvelles méthodes d'imagerie pour explorer le retentissement de l'infarctus du myocarde au niveau du cœur, 2) comprendre la variabilité des mesures et des résultats en fonction du délai de prise en charge 3) préconiser une chronologie d'exploration post-infarctus et des protocoles d'imagerie optimisés, 4) valider de nouvelles méthodes d'exploration par imagerie dédiée à l'étude spécifique de l'inflammation.

En effet, nous avons besoin de comprendre comment l'état inflammatoire du cœur, au moment de la thérapie, peut influencer les résultats thérapeutiques eux-mêmes. La valeur des mesures quantitatives dérivées de l'imagerie (importance de l'œdème, taille de l'infarctus, lien entre les deux etc...) pourraient donc être cruciales mais doivent être validées par l'exploration expérimentale sur un modèle d'infarctus réalisé chez le porc.

Cette étape cruciale et préalable à toute étude clinique ultérieure, permettra de suivre chronologiquement la mise en place de la lésion ischémique, puis l'effet de la reperfusion, avec des mesures effectuées toutes les 10min environ, et d'évaluer la performance de nos biomarqueurs d'imagerie pour caractériser l'état du tissu au sein organe. Cette phase aiguë de la maladie n'est pas explorable chez l'homme compte tenu de l'urgence à reperfuser qui est la prise en charge classique.

Cette expérimentation nécessitera au total un maximum de 20 porcs.

La procédure classée sans réveil, sera réalisée sur animaux anesthésiés avec une prise en charge de la douleur due à la chirurgie, les techniques de protection utilisées sont sans douleur associée.

Après expérimentation, les porcs seront euthanasiés en conformité avec les procédures autorisées, et du matériel biologique pourra être prélevé en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (règle des 3R) : prélèvement reins, du cœur, éventuellement du cerveau pour tests de conservation des organes, prélèvements peau par une équipe de dermatologie, prélèvements muscles pour tests bioénergétique.

13956 Pour apporter des solutions thérapeutiques au paludisme mais également bloquer les échanges entre le vecteur et l'hôte il a été nécessaire de trouver des souches de Plasmodium capables d'infecter des rongeurs de laboratoires. Sept souches de plasmodium sont capables d'infecter des rongeurs.

Dans le cadre expérimental, les infections sont réalisées manuellement à partir de sang de souris infectées et préalablement cryo-préservé d'un groupe de souris donneuses vers un groupe de souris receveuses. Ce groupe receveur constitue le groupe utile à la démarche de recherche scientifique. L'entretien et l'amplification de la souche, est nécessaires afin d'assurer des expériences reproductibles. Cette démarche doit être renouvelée en cas d'épuisement des stocks précédemment réalisés, ou en cas de perte de virulence. En effet des infections réalisées manuellement et de façon récurrente avec Plasmodium chez un rongeur entraînent un allongement de son cycle, une perte de virulence pour les formes graves de ce modèle

Il convient donc de maintenir la souche par des passages répétés chez le moustique

Deux procédures expérimentales sont prévues afin de mener à bien ce projet, en prenant en compte la règle des 3R:

I) Décongélation des souches murines cryo-préservées de Plasmodium spp et infection des souris

II) Amplification des sept souches de paludisme murin présentes dans notre laboratoire après passage chez le moustique

L'obtention de souches virulentes de Plasmodium dans le modèle murin nécessite par définition, un organisme vivant et entier. Cela est d'autant plus pertinent afin d'observer la virulence et le maintien des atteintes multi-viscérales caractéristiques du modèle.

En accord avec le principe de réduction des effectifs, les effectifs de souris seront calculés afin de garantir le minimum d'animaux et le meilleur rendement pour la production des échantillons cryo-préservés. Les organes et tissus seront prélevés après la mort afin de les comparer à ceux déjà obtenus lors de nos précédentes expériences. Nous espérons mettre en évidence une augmentation de la virulence par rapport aux souches entretenues par des infections manuelles. La récupération des échantillons biologiques permet également de limiter les expériences complémentaires ultérieures avec de nouveaux animaux vivants. Le remplacement par une méthode alternative n'est pas possible. Il est important que le cycle de ces souches infectant normalement les rongeurs soit réalisé dans son intégralité aussi bien chez l'insecte que chez le rongeur. Le choix du modèle murin C57BL6/J repose sur notre maîtrise complète du modèle, en tant que rongeur infecté et des outils nécessaires à son évaluation. Le nombre de souris a été évalué à 49 femelles matures pour l'expérience.

Les dommages escomptés se situent au niveau du modèle, il faudra infecter des animaux avec une souche létale.

Les différentes souches de plasmodium murin sont des organismes modèles pour l'étude du paludisme humain.

En accord avec le principe de raffinement, les signes de souffrance seront recherchés et évalués. Une attention particulière sera portée à l'enrichissement des rongeurs, de manière à limiter leur anxiété. Des abris, et des éléments à ronger seront placés dans les cages et les souris seront habituées à la manipulation.

13957 Malgré des progrès importants dans la compréhension de la physiopathologie des thromboses artérielles, les maladies ischémiques (infarctus du myocarde, la plupart des accidents vasculaires cérébraux et les artériopathies périphériques invalidantes) restent la première cause de morbi-mortalité dans les pays développés. Les plaquettes, qui sont des petites cellules du sang, sont avant tout responsables de l'arrêt du saignement, encore appelé hémostasie, lors de la survenue d'une brèche dans un vaisseau. Les plaquettes ont également un rôle majeur dans la survenue des thromboses artérielles, par leur capacité à former des agrégats qui bouchent les artères. Le traitement des maladies ischémiques consiste principalement à administrer des médicaments qui

inhibent l'agrégation des plaquettes et ainsi les thromboses. Cependant, des progrès restent à faire pour obtenir des traitements plus efficaces.

Le récepteur FcGR1IA, encore appelé CD32A, est un récepteur pour les immunoglobulines G (IgG), présent sur les plaquettes sanguines, uniquement d'origine humaine. En effet, les plaquettes sanguines des souris n'expriment pas ce récepteur aux IgG. Or, la stimulation de ce récepteur CD32A par les IgG entraîne une activation forte des plaquettes humaines ou des plaquettes de souris transgéniques exprimant ce récepteur CD32A. Il est ainsi légitime de se demander si la présence du CD32A sur les plaquettes de souris intervient dans les fonctions des plaquettes sanguines d'arrêt du saignement ou de formation d'une thrombose artérielle. Ces rôles potentiels du récepteur CD32A dans l'hémostase et la thrombose n'ont jamais été évalués *in vivo* chez la souris.

La thrombose est un processus intégré qui fait intervenir de multiples acteurs cellulaires (cellules sanguines -plaquettes, leucocytes-, paroi vasculaire), les protéines plasmatiques et le flux sanguin. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par ces phénomènes intégrés. Ainsi, il est nécessaire de recourir à un modèle animal permettant de modéliser au plus proche les caractéristiques de la pathologie humaine et ainsi comprendre les mécanismes mis en jeu.

Notre objectif est d'évaluer le rôle du CD32A dans l'hémostase et la thrombose à l'aide de souris transgéniques « humanisées », c'est-à-dire exprimant la protéine CD32A d'origine humaine. Cette évaluation sera réalisée dans différents modèles de thrombose chez la souris. Ces modèles, qui diffèrent par leur mode d'induction et les mécanismes d'activation des plaquettes, permettent de couvrir les situations pathologiques différentes, rencontrées chez l'homme. Ces travaux permettront d'une part, de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de la thrombose et, d'autre part, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés. Ces nombres d'animaux ont été déterminés de façon à obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Durant l'anesthésie, la température corporelle est maintenue grâce à un tapis chauffant. Des points limites prédictifs ont été établis permettant d'interrompre les procédures limitant ainsi la souffrance animale. Toutes les expériences de thrombose seront réalisées sur des animaux anesthésiés. Elles ont une durée maximale de 40 min. Les animaux sont ensuite mis à mort avant leur réveil. Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont pris en charge par du personnel compétant et entraîné.

Remplacer : Le recours à l'utilisation d'animaux est justifié par le fait que les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent la thrombose sont difficiles, voire impossible à étudier chez l'homme, vue l'imprévisibilité de l'évènement. Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études *in vitro* sur plaquettes isolées du sang des souris.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 320 souris.

13958 Les plaquettes sanguines jouent un rôle clé dans l'arrêt du saignement. Suite à une lésion vasculaire elles adhèrent à la paroi lésée et s'activent sous l'effet d'agonistes solubles comme l'adénosine diphosphate (ADP) et le thromboxane A2 (TXA2) pour former un clou hémostatique qui stoppe les saignements. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ont été clairement identifiés.

Les plaquettes participent également au maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation dans des organes tels que la peau, le poumon ou le cerveau. Ceci a été démontré par le fait que l'absence de plaquettes (thrombopénie) induit des saignements au niveau d'un site présentant une inflammation. A ce jour, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent obscurs et il a été proposé

que ces mécanismes diffèrent de ceux de l'hémostase primaire, impliqués dans l'arrêt des saignements suite à une lésion vasculaire.

Comprendre le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire et dans l'arrêt du saignement au niveau du site inflammatoire peut avoir des applications pour soigner des patients qui présentent des saignements lors d'une réaction inflammatoire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance des récepteurs plaquettaires aux agonistes solubles dans le maintien de l'intégrité vasculaire en conditions inflammatoires. Ces récepteurs sont représentés par les récepteurs à l'ADP (P2Y1 et P2Y12) et le récepteur au TXA2 et à la prostaglandine (TP). Pour cela des animaux seront soumis à deux modèles d'inflammation cutanée locale ainsi qu'à un modèle d'inflammation pulmonaire. Ces modèles sont complémentaires puisqu'ils permettent d'observer le phénomène au niveau de différents organes.

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle des récepteurs aux agonistes solubles des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors de réactions inflammatoires.

L'inflammation cutanée et pulmonaires concernent essentiellement les vaisseaux sanguins, les membranes séreuses (thorax, abdomen, plèvre), le péricarde et la membrane synoviale. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par ces phénomènes intégrés.

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement

Le stress et la douleur des animaux utilisés dans ce projet seront réduits au maximum :

- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de l'anesthésie afin de lutter contre l'hypothermie, application d'un gel protecteur, ocrygel, à la surface des yeux pendant l'anesthésie
- Anesthésie de l'animal pour toute procédure susceptible d'induire une douleur
- Injection d'analgésique pendant et après chaque procédure chirurgicale

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. Une grille de points limites a été établie afin de soustraire l'animal aux procédures si nécessaire pour limiter la souffrance animale.

Cette étude sera réalisée suivant un chronogramme. La nécessité de réaliser les différents modèles sera déterminée en fonction des analyses des résultats obtenus à chaque étape du projet. Elle nécessitera au maximum l'utilisation de 864 souris.

13959 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer.

Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Les symptômes ont été associés par une perte de neurones produisant la dopamine au niveau cérébral.

Il n'y a aucun traitement pour guérir cette maladie. Le développement de nouveaux outils thérapeutiques est donc essentiel.

Notre stratégie est donc d'étudier l'effet d'un nouveau traitement (transplantation de cellules humaines) sur le modèle rongeur d'induction de la maladie de Parkinson. Le comportement moteur des rats sera aussi évalué. Les animaux seront mis à mort après le traitement et des analyses histologiques et neurochimiques seront faites afin de visualiser l'effet du traitement sur la perte des neurones dopaminergiques.

L'effet d'une transplantation cellulaire nécessite un système cérébral entier pour tester la survie de la greffe et son intégration dans les réseaux neuronaux restant. De plus, l'analyse des effets du

traitement sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement et les modèles *in vitro* actuels ne pouvant répondre à notre question.

Nous allons utiliser un nombre d'animaux de 288. Nous souhaitons comparer l'efficacité de différentes greffes neuronales. Afin de réduire le nombre d'animaux tout en ayant assez de données pour établir des statistiques solides, nous utilisons un nombre de 12 animaux par groupe. Pour le respect du R de raffiner, les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via des molécules les plus adéquates. Les rats seront également maintenus en groupe sociaux et les cages seront enrichies par des nids et tunnels.

Tout le long des expériences, plusieurs critères seront pris en compte pour suivre le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. A la fin de l'expérience, les animaux seront mis à mort de façon indolore pour des contrôles histologiques.

13960 Le mannitol est une molécule de la famille des polyols utilisée comme substitut du sucre par l'industrie agroalimentaire. Il présente aussi de multiples applications en médecine du fait de ses propriétés d'osmorégulation, c'est-à-dire de régulation de la pression osmotique exercée par les fluides de part et d'autre des membranes cellulaires. Il est administré aux patients dans certains cas de défaillance rénale afin d'améliorer la diurèse (élimination de l'urine). Il est aussi utilisé dans le traitement de certaines tumeurs cérébrales afin de faciliter le passage des molécules anti-cancéreuses à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) protégeant le cerveau. Il permet aussi de réduire la pression intracrânienne survenant dans un contexte d'œdème cérébral c'est-à-dire d'accumulation anormale d'eau dans le tissu cérébral, en favorisant l'élimination d'eau.

Le passage de molécules à travers la BHE ainsi que la résorption des œdèmes cérébraux résulteraient de l'action du mannitol sur les cellules de l'endothélium vasculaire. Il est admis que l'administration de mannitol favorise la déshydratation de ces cellules ce qui entraînerait l'ouverture de pores entre les cellules laissant passer les agents thérapeutiques et sortir l'eau.

De nouveaux agents d'imagerie cérébrale permettant la reconnaissance spécifique de certaines populations cellulaires ou de lésions (exemple : cellules tumorales, cicatrice gliale...), ou l'imagerie et la destruction sélective de ces cellules par des agents d'imagerie dits théranostiques sont en cours de développement. L'étude préclinique de la spécificité et de l'efficacité de ces agents ne peut se faire sans recourir à une méthode de vectorisation (les agents d'imagerie sont chimiquement associés à des peptides dits « vecteurs » favorisant le passage à travers la BHE) ou d'ouverture mécanique temporaire de la BHE (application d'ultrasons focalisés ou injection de mannitol). L'injection de mannitol présente l'avantage d'avoir fait ses preuves en clinique depuis de nombreuses années, ce qui serait susceptible d'accélérer l'évaluation en recherche clinique d'agents ayant démontré une efficacité dans les études précliniques. Toutefois, bien que l'utilisation du mannitol chez l'homme soit relativement bien documentée, son emploi chez l'animal est peu décrit. De plus, il n'existe pas de consensus sur la voie d'administration (ex : intra-artérielle, intraveineuse, intrapéritonéale...), ni sur les doses administrées. Les doses mentionnées dans la littérature sont généralement peu physiologiques et souvent incompatibles avec la survie des animaux car entraînant une déshydratation sévère et sont donc inadaptées aux études longitudinales. Enfin, la dynamique du processus d'ouverture est inconnue, notamment en termes de délai d'attente post-injection et de durée de la fenêtre d'ouverture. Ces informations sont indispensables pour l'administration efficace d'agents d'imagerie et/ou thérapeutiques en recherche préclinique.

Le but de ce projet de recherche est d'optimiser l'administration de mannitol chez la souris en privilégiant si possible la méthode la moins invasive. Nous déterminerons la dose permettant l'ouverture de la BHE sans compromettre la survie de l'animal et nous étudierons la dynamique de l'ouverture de la BHE par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) cérébrale sous anesthésie avec injection d'un agent de contraste (Gd-DOTA). Il sera ainsi possible de suivre les changements de perméabilité de la BHE et de cartographier à la fois temporellement et spatialement son ouverture et sa fermeture.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 77 souris adultes au maximum sur 18 mois. Les animaux seront explorés sur un spectromètre imageur préclinique opérant à 7T dédié à la souris. Cette étude sera conduite dans le respect du principe éthique des 3 R. Le recours à l'animal étant incontournable, nous réduirons le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de l'IRM, une méthode non invasive permettant le suivi longitudinal d'un même animal, et l'emploi de tests statistiques pour le calcul de la taille des effectifs. Le raffinement concernera la diminution du stress et de la douleur. L'anesthésie sera utilisée pour les injections et les explorations par IRM. Les points limites préalablement définis seront strictement respectés. Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux, avec cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum et enrichissement environnemental. Les cages contiendront des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette).

13961 Caractérisation de la bioaccumulation et des interactions du méthylmercure et du sélénium chez le poisson pour une meilleure évaluation des risques pour l'alimentation humaine

Le mercure (Hg) est l'un des contaminants chimiques les plus dangereux pour l'Homme et l'environnement. Bien qu'il soit présent à de très faibles concentrations dans l'eau et les sédiments sous sa forme méthylée appelée méthylmercure (CH₃Hg), il peut se concentrer dans les organismes le long de la chaîne alimentaire. En effet, suite à de nombreuses transformations chimiques, le mercure devient toxique et facilement absorbable par l'organisme. La principale source d'exposition de l'Homme au méthylmercure est la consommation de poissons. En dépit de l'extrême toxicité du CH₃Hg et de sa présence avérée dans les produits de la pêche, il n'y a pas de réglementation pour ce contaminant dans les denrées alimentaires. Par ailleurs, la biodisponibilité du mercure dans la chair des poissons semble être liée au taux de sélénium (Se) qui pourrait exercer un rôle protecteur contre la toxicité du mercure. Cependant, le(s) mécanisme(s) associé(s) ne sont pas clairement identifiés, tout comme le devenir des espèces de mercure et leurs interactions avec le sélénium lors de la cuisson du poisson.

Le projet a pour but d'étudier le processus de bioaccumulation du CH₃Hg chez la truite arc-en-ciel en présence de différentes espèces de sélénium, notamment le sélénium inorganique (SeIV) et une forme de sélénium organique (seleno-méthionine, SeMet). Des prélèvements de muscles et de foie seront effectués en cinétique pour suivre le taux d'accumulation du CH₃Hg dans les poissons en présence de chaque espèce de sélénium sur une période de trois mois. De plus, l'antagonisme Hg-Se dans les poissons sera évalué afin de mieux comprendre le potentiel effet protecteur du sélénium contre la toxicité du mercure dans les poissons. Cette procédure expérimentale utilisera 90 poissons dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement dans la gestion des lots de poissons. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux : volume d'eau adapté avec une oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, une alimentation adaptée à leur stade de vie mais également d'appliquer des mesures pour réduire la douleur des individus pendant les procédures expérimentales. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable puisqu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ce type de travaux.

13962 Une inflammation est une réaction de défense immunitaire du corps à une agression externe comme une infection, un trauma, une brûlure ou une allergie. Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir principalement les globules blancs et des protéines circulantes, comme des anticorps par exemple. Outre les globules blancs, les plaquettes sanguines dont le rôle est avant tout d'assurer l'arrêt du saignement en cas de rupture d'un vaisseau, pourraient également jouer un rôle lors d'une inflammation. En effet, des travaux récents menés chez la souris, suggèrent que les plaquettes sanguines auraient un rôle prépondérant et bénéfique dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors

d'une inflammation. Ce rôle serait dû à deux récepteurs présents sur les plaquettes, à savoir les protéines GPVI et CLEC-2, appartenant toutes les deux à la famille des récepteurs ITAM. Il existe un troisième membre de cette famille présent sur les plaquettes, mais uniquement d'origine humaine, le récepteur FcγRIIIa, encore appelé CD32A, qui est un récepteur pour les anticorps IgG. En particulier, les plaquettes sanguines des souris n'expriment pas de récepteurs aux immunoglobulines. Or, la stimulation de ce récepteur entraîne une activation forte des plaquettes humaines, ou des souris transgéniques pour ce récepteur. Il est ainsi légitime de se demander si la présence du CD32A sur les plaquettes de souris intervient lui aussi dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation.

Les mécanismes cellulaires participant au développement de l'inflammation sont complexes, aussi leur compréhension requiert des explorations expérimentales complémentaires *in vitro* et, *in vivo* dans des modèles animaux. Ainsi, le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation, sera évalué chez la souris transgénique « humanisée », c'est-à-dire exprimant la protéine CD32A d'origine humaine, et des souris témoins, n'exprimant pas le CD32A, dans deux modèles expérimentaux d'inflammation pulmonaire induits soit par les lipopolysaccharides (LPS), extraits de la paroi des bactéries, soit par des complexes immuns (formés entre un antigène et son anticorps) qui seront tous injectés aux souris. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire en conditions inflammatoires.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés. Ces nombres d'animaux ont été déterminés de façon à obtenir des résultats statistiquement significatifs. Une analyse de variances de type ANOVA avec un post-test Bonferroni sera réalisée entre les groupes.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés ;
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état ; les animaux sont hébergés dans des cages (3 souris/cage) individuellement ventilées contenant un nid en coton compressé et de la frisure de papier Krafft afin de leur permettre d'exprimer leur comportement de nidification naturel et de d'organiser leur environnement.
- les expériences sur animaux vigile auront une durée limitée dans le temps ;
- pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel expérimenté.
- Des points limites prédictifs ont été établis permettant d'interrompre les procédures limitant ainsi la souffrance animale.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études *in vitro* sur plaquettes isolées du sang des souris.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 412 souris.

13963 Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'efficacité de traitements anti-cancéreux. Chez les patients atteints d'un cancer, on observe un déséquilibre de la flore intestinale mais également une altération de l'état général de l'intestin. On peut observer une inflammation de l'intestin et une augmentation de sa perméabilité. Il perd alors sa fonction de barrière contre les éléments indésirables pouvant alors entrer dans l'organisme. De plus, cette altération de l'intestin peut diminuer l'efficacité des traitements anti-cancéreux.

L'objectif de cette étude est de trouver des traitements qui puissent améliorer l'état de l'intestin chez des souris qui ont été implantées avec une tumeur et de voir si ces traitements peuvent améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux.

Pour cela, des souris porteuses de tumeurs subiront différents traitements puis nous analyserons s'il y a une amélioration de l'état de l'intestin. Les différents traitements auront pour but de diminuer ou augmenter la présence de certaines molécules (hormones anti-inflammatoires, protéines induisant la mort des cellules, protéines diminuant la perméabilité de l'intestin) ou de certaines cellules (cellules du système immunitaire) jouant un rôle dans la structure, la perméabilité, et

l'inflammation de l'intestin. Nous allons également tester différents régimes alimentaires (riche en gras ou riche en fibre) chez des souris porteuses de tumeur ou utiliser des souris obèses auxquelles on implante une tumeur. Ainsi nous pourrions déterminer si l'alimentation peut améliorer l'état de l'intestin et si cet effet bénéfique passe par une modification de la flore intestinale ou non.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, la flore, la structure et l'inflammation de l'intestin et l'efficacité des traitements anti-cancéreux dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire en culture de cellules. Le projet est prévu pour une durée de 3 ans et nécessitera 3528 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différents types de tumeurs implantées, les différents traitements injectés, les différents types de souris utilisées, les différents régimes alimentaires administrés.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Une expérience préliminaire sera réalisée afin de déterminer le meilleur jour après l'injection de tumeur pour analyser l'état de l'intestin, ce qui permettra d'utiliser moins de souris pour les expériences suivantes. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie locale ou générale dépendant des gestes techniques.

La contrainte principale pour les animaux sera l'implantation de tumeurs. Ces contraintes seront limitées par un suivi très strict avec application de points limites, limitation des tailles de tumeurs par mesure physique (sous-cutanée) ou au moyen d'imagerie optique de luminescence des animaux (qui permet aussi un suivi longitudinal non invasif plus raffiné).

13964 Contexte scientifique

Les muscles squelettiques ont pour fonction de générer force et mouvement afin d'assurer la motricité du corps dans son environnement. Cette production de force est assurée par des moteurs moléculaires nécessitant de l'énergie chimique présente dans la cellule sous forme d'ATP. L'ATP est essentiellement produite par les mitochondries, des organites présents en grande quantité dans les cellules musculaires. Au cours de la vie, les mitochondries musculaires subissent des modifications importantes au niveau de leur morphologie et de leur quantité. En particulier, on observe une réduction de leur volume et de leur densité lors de la perte musculaire (sarcopénie) induite par le vieillissement et par la maladie. Une fonte musculaire est en effet fréquemment observée dans de nombreuses pathologies dont le cancer du pancréas. Ce type de cancer entraîne une diminution de la masse musculaire pouvant atteindre 20 à 30% ce qui, en plus de réduire l'efficacité des traitements, provoque un affaiblissement généralisé qui augmente la mortalité. Il est à présent clairement établi que le développement de la sarcopénie s'accompagne de l'apparition de dysfonctionnements mitochondriaux qui se traduisent non seulement par une diminution de la capacité à produire l'ATP mais également par une surproduction d'espèces chimiques oxygénées (radicaux libres) favorisant la mort cellulaire. De manière intéressante, des études ont associé ces dysfonctionnements mitochondriaux avec une dégradation de la fonction musculaire (fatigabilité accrue, diminution de la capacité à produire la force). Cependant, les relations de cause à effet entre perte de masse musculaire, dysfonctionnement mitochondrial et altération de la fonction musculaire demeurent des sujets controversés en partie à cause des différentes mesures utilisées pour évaluer la fonction mitochondriale. Par ailleurs, il est important de souligner que bien que le développement de la sarcopénie soit moindre chez les femmes (comparé aux hommes), l'atteinte mitochondriale de leur muscle est plus importante, ce qui démontre un effet du sexe. De plus, nous en savons très peu sur les modifications moléculaires au sein de la mitochondrie au cours du développement de la sarcopénie. Etant donné l'augmentation des cas de cancer en partie liée au vieillissement des populations, il est urgent de mieux comprendre les bases fondamentales de

l'implication de la mitochondrie dans le développement de la sarcopénie cancéreuse, ceci notamment pour la mise au point de stratégies thérapeutiques permettant de lutter contre ce type d'amyotrophie.

Objectif du projet

L'objectif de ce projet est d'analyser au cours du développement de la sarcopénie cancéreuse les modifications morphologiques et métaboliques de la mitochondrie en relation avec la structure et la fonction musculaire. Les données obtenues seront précieuses pour toute la communauté scientifique car elles permettront de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans ces modifications morphologiques et métaboliques, et ainsi identifier des cibles potentielles susceptibles de prévenir ou de retarder la perte musculaire induite par le cancer. Par conséquent, nos résultats sont susceptibles d'avoir des impacts économique et sociaux-culturels majeurs sur notre population qui aspire à vieillir en bonne santé.

Le projet sera réalisé chez des souris génétiquement modifiées (KIC) qui présentent une prédisposition pour développer un cancer du pancréas et une sarcopénie associée.

Nous allons utiliser une approche pluridisciplinaire combinant des mesures *ex vivo* sur échantillons musculaires (obtenus post-mortem) permettant de déterminer l'organisation tissulaire, la fonction mitochondriale et l'expression des gènes mitochondriaux (par biologie moléculaire),

Conformité de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement)

Concernant le remplacement, le recours aux animaux est indispensable pour ce projet. En effet, les données expérimentales devront être en grande partie obtenues sur des échantillons musculaires provenant d'organismes sarcopéniques, et cette démarche ne peut pas être réalisée chez l'homme. Par ailleurs, les critères métaboliques et fonctionnels que nous allons étudier sont de types physiologiques, et ne sont donc pas reproductibles avec des cultures de cellules musculaires ; c'est pourquoi nous ne pouvons pas remplacer l'étude chez l'animal vivant. Toutefois, nous n'utiliserons que le nombre de souris nécessaires pour l'exploitation statistiques des données, à savoir 90 individus (6 groupes de 15 souris KIC des deux sexes à 3 âges différents) conformément à la règle de réduction.

Concernant le raffinement, les souris seront hébergées collectivement (4 à 5 animaux par cage de 530 cm²) et le milieu sera enrichi par la présence dans chaque cage de matériel de nidation : en alternance tiges de papier, abris en carton, pelotes de lanières de papier. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies *ad libitum*. Le changement des litières aura lieu une fois par semaine.

De plus, nous avons déterminé des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être de l'animal: un contrôle quotidien de l'état clinique de nos animaux sera réalisé selon un système d'évaluation avec indices de 0 (normal ou léger) à 3 (changements importants par rapport à la normale) pour différents critères physiologiques et comportementaux (tableau de score fourni en annexe). Tout animal obtenant un score total supérieur ou égal à 7 ou un score de 3 dans une des catégories sera mis à mort.

Conclusion

Cette étude permettra de nous éclairer sur l'implication des mitochondries dans la sarcopénie cancéreuse, cette connaissance pouvant être mise à profit d'une meilleure prise en charge des patients dont le cancer s'accompagne d'une cachexie.

13965 Le cerveau est constitué de neurones et d'un autre type de cellules, les cellules gliales, auxquelles appartiennent les astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, le rôle des astrocytes et leurs interactions avec les neurones reste très largement méconnu. Les astrocytes ont longtemps été essentiellement considérés comme support métabolique des neurones mais de plus en plus d'études montrent que ces cellules sont également impliquées dans la régulation de l'activité neuronale. Le but de ce projet est précisément d'étudier les relations neurones-astrocytes lors d'interactions sociales, un processus cognitif complexe impliquant les circuits neuronaux du décodage de l'environnement et des émotions ainsi que de la prise de décision. Ces interactions seront analysées chez l'adulte lors de conditions

physiologiques et pathologiques avec des modèles de syndromes autistiques connus pour présenter des altérations du comportement social. Au cours de ce projet nous étudierons également les effets de l'ocytocine, une hormone pro-sociale synthétisée par les neurones de l'hypothalamus, sur les relations neurogliales au cours de ces événements.

Pour mesurer l'impact des astrocytes et de l'ocytocine sur les interactions sociales, nous mettrons en place différentes méthodes sur un modèle murin. Ce projet nécessite des expériences chez l'animal entier car nous nous intéressons à l'activité des cellules lors de comportements sociaux entre individus vivants. Ces expériences mobilisent différentes aires cérébrales et requièrent l'intégrité des réseaux neuronaux et gliaux qui ne peuvent être remplacés par des modélisations informatiques ou *in vitro* avec des cellules en culture.

Ce projet de recherche fondamentale se déroulera sur 5 ans et nécessitera 596 souris. Nous effectuerons des enregistrements chroniques des activités neuronales et astrocytaires sur l'animal éveillé lors de tâches comportementales.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante. Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Nous réduirons au maximum la douleur et le stress générés par l'expérimentation en utilisant de façon adaptée des produits anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles avec des milieux enrichis lors d'isolement. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et y pallier.

13966 Contexte

Les infections de plaies traumatiques et chirurgicales sont un problème majeur dans le domaine médical. L'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est un phénomène inquiétant. Les cas de patients infectés par ce type de bactéries sont de plus en plus fréquemment rapportés en France, entraînant de grandes difficultés de prise en charge de ces patients. Sans remettre en cause l'intérêt des antibiotiques dans les situations qui les nécessitent et pour lesquelles ils ont fait la preuve de leur efficacité, il faut réduire les résistances aux bactéries due aux antibiotiques prescrits inutilement et en ce sens, la notion de « bon usage » des antibiotiques doit être élargie à la notion de « moindre usage ». Dès lors, il existe un besoin croissant d'utilisation de produits antimicrobiens topiques (application directement sur le site d'infection) pouvant être appliqués sur des plaies potentiellement infectées. Le chitosane est utilisé pour de nombreuses applications médicales et pharmaceutiques. Les préparations de chitosane ont beaucoup attiré l'attention en raison de leurs propriétés biologiques potentiellement bénéfiques. Ces propriétés incluent notamment l'hémostase (la coagulation), l'activité antimicrobienne et la stimulation de la guérison. L'activité antimicrobienne à large spectre du chitosane a suggéré qu'il pourrait être utilisé comme pansement pour plaie.

Description du projet

Les objectifs de ce projet seront de confirmer dans un modèle murin, les propriétés antibactériennes d'un pansement à base de chitosane fonctionnalisé sur une plaie contaminée par des bactéries en comparaison à un pansement chitosane non fonctionnalisé en utilisant des bactéries émettant de la lumière. Si les résultats attendus sont confortés, cela confirmera la capacité de ces pansements pour constituer des pansements anti-microbiens dans des applications cliniques.

Justification et contexte lié aux 3R.

- l'analyse bibliographique a été menée au préalable afin de sélectionner les formulations les plus intéressantes à tester *in vivo* pour réduire au maximum le nombre de tests.
- Remplacer : Les données manquantes sur les propriétés antimicrobiennes ne peuvent être menées que sur l'animal entier vivant : la réaction inflammatoire, hémostatique et hémodynamique sont des processus vivants et dynamiques, mettant en jeu des mécanismes complets qui ne

peuvent être reproduits *in vitro*. L'utilisation de peau reconstruite en 3D ne permet pas d'étudier l'effet systémique des surinfections bactériennes.

- Réduire : La réduction du nombre d'animaux utilisés se fait par la réduction du nombre d'animaux utilisés pour chaque expérimentation. En effet, l'utilisation de l'imagerie (par rayonnement lumineux) permet dans ce projet d'avoir un suivi longitudinal et de suivre les propriétés anti-bactériennes du pansement sans réaliser de prélèvements.

- Raffiner : Trente-deux souris seront incluses dans l'étude. Tout le projet sera conduit dans des locaux agréés, avec du personnel dédié et expérimenté. Un protocole précis de prémédication, d'analgésie, d'anesthésie et d'euthanasie est mis en place. Les souris auront une période d'acclimatation d'au moins une semaine avant l'implantation. Elles seront hébergées dans une animalerie conventionnée, avec eau et alimentation ad libitum, dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées, avec un cycle jour/nuit de 12h.

L'inoculation de bactéries et la mise en place des pansements seront réalisés sous anesthésie générale avec analgésie préopératoire et post-opératoire.

Les animaux seront observés quotidiennement : état général, alimentation, abreuvement, nettoyage, morbidité et mortalité.

En cas d'animal considéré comme anormal, la personne en charge des observations :

-manipulera l'animal pour confirmer ou infirmer cet état

-Toutes anomalies cliniques seront signalées au vétérinaire pour un examen clinique complet si nécessaire.

La douleur et le bien-être sont évalués selon des paramètres précis. En cas de signe de douleur importante, des antalgiques seront administrés jusqu'à disparition des signes. Si une souffrance et/ou une détresse de l'animal est mise en évidence, des mesures seront directement mise en place : fin de la procédure, traitement afin de soulager la souffrance, euthanasie.

13967 Dans nos sociétés, la consommation alimentaire a beaucoup évolué et est actuellement souvent motivée par le plaisir plus que par la sensation de faim. Ce phénomène peut entraîner des troubles de l'alimentation et devenir la cause de maladie comme l'obésité. La recherche actuelle chez l'homme (imagerie cérébrale) et la mise en place de modèles chez le rongeur, qui permettent d'explorer les activations cérébrales associées à la prise de nourriture, suggèrent l'existence de circuits neuronaux communs entre la consommation d'aliments savoureux et la dépendance aux drogues, maladie du cerveau complexe et récurrente, qui n'est que partiellement comprise. Les endocannabinoïdes sont des neuromédiateurs fortement impliqués dans la régulation fine du circuit de la récompense, quelle que soit la nature des renforçateurs (nourriture ou drogue). Nous pensons qu'ils pourraient notamment jouer un rôle dans la consommation excessive de sucre.

Dans ce contexte, notre projet a pour but (1) d'utiliser un modèle de consommation excessive de sucre (saccharose) chez le rat afin d'examiner les mécanismes biologiques sous-jacents ; et dans ce modèle, (2) de caractériser le comportement des rats (récompense, anxiété, locomotion) ; (3) de mesurer les adaptations moléculaires induites par la consommation ; (4) d'évaluer le rôle des endocannabinoïdes par une approche pharmacologique. Cette étude s'inscrit dans un projet plus vaste qui prévoit de comparer les changements observés avec ceux induits par une surconsommation de cocaïne, réalisée au laboratoire chez le rat. L'ensemble de cette étude ouvrira des pistes pour mieux comprendre les mécanismes centraux impliqués dans les comportements addictifs et proposer des stratégies thérapeutiques.

Remplacement : dans la mesure où nos travaux portent sur la caractérisation comportementale et moléculaire d'une prise alimentaire excessive, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier. Nos études préalables de toxicomanie ayant été conduites chez le rat, nous avons choisi ce modèle rongeur.

Raffinement : La surveillance des animaux est journalière (observation visuelle, suivi de l'aspect général et de la posture) et une pesée quotidienne est réalisée lors du suivi de la consommation de sucre pour s'assurer du bien-être des animaux. L'approche pharmacologique nécessite une

chirurgie qui sera réalisée sous anesthésie, et une couverture antalgique et un monitoring de l'état d'anesthésie sont prévus. De plus, une attention particulière sera portée aux animaux avec des points limites précis selon une grille de score.

Réduction : nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre des analyses statistiques et avons adapté ce nombre selon le type d'expérience (10 rats/groupe pour le comportement, et les analyses moléculaires et 12 rats/groupe pour la pharmacologie). De plus, l'analyse pharmacologique ne sera faite sur les deux sexes que si les résultats comportementaux diffèrent entre les sexes. De même, l'analyse moléculaire par séquençage est envisagée sur un seul sexe. Dans ce contexte de la règle des trois R, nous anticipons que ce projet nécessitera au maximum 942 rats.

13968 Dans nos sociétés vieillissantes, les problèmes de mémoire liés à des conditions pathologiques ou à l'âge prennent une place grandissante. Il devient donc crucial de comprendre les mécanismes neurobiologiques de la mémoire pour améliorer les diagnostics médicaux et développer de futurs traitements. Notre travail vise précisément à comprendre le fonctionnement du cerveau à l'échelle des réseaux neuronaux, lorsque celui-ci forme et manipule des souvenirs. Les résultats issus de nos travaux auront donc des implications importantes dans le domaine de la santé, pour l'amélioration des conditions de vie humaine.

La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés et l'étude de fonctions cognitives complexes. L'organisation cérébrale chez cette espèce est relativement proche de celle de l'Homme, ce qui permet d'exploiter les résultats obtenus pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la fonction mnésique dans l'espèce humaine.

Nous mettrons en œuvre des tâches comportementales qui reflètent les comportements naturels des animaux utilisés. L'odorat est une modalité sensorielle majeure chez les souris, nécessaire à l'établissement de comportements cruciaux pour la survie de l'individu (alimentation, reproduction, interactions sociales...). La signification associée aux odeurs rencontrées, qui permet la production de comportements adaptés, est le plus souvent apprise par expérience.

Le but du projet est de comprendre les mécanismes neuronaux mis en place quand l'animal forme et manipule un souvenir en lien avec l'olfaction. Plus précisément lorsque la souris apprend :

- 1) l'apprentissage d'une association entre une odeur et une récompense
- 2) l'apprentissage d'une association entre une odeur et une trajectoire dans un labyrinthe,
- 3) à reconnaître un individu (cette mémoire dite « sociale », mise en jeu en conditions naturelles, se base principalement sur l'olfaction et permet la reconnaissance entre individus).

Au cours de ces tâches, nous enregistrerons, en simultané, l'activité de dizaines de neurones grâce à des électrodes très fines placées au préalable dans les régions cérébrales impliquées ainsi que la respiration. La richesse des informations collectées et le grand nombre de neurones enregistrés via cette méthode sont tels, qu'il nous sera possible de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés.

En complément, nous testerons l'impact de sous-populations de neurones sur l'activité du réseau et le comportement de l'animal, en contrôlant leur activité avec une grande précision spatio-temporelle. Les lignées de souris nécessaires à l'utilisation de cette technique ne présentent pas de phénotypes dommageables.

Les procédures de ce projet sont les suivantes :

- Restriction en eau de boisson, nécessaire à l'entraînement des animaux : l'eau est offerte comme récompense et devient source de motivation.
- Chirurgies cérébrales sous anesthésie profonde et analgésie : pour placer les outils nécessaires aux enregistrements et à la manipulation des circuits neuronaux
- Mise à mort : pour prélèvement des cerveaux et étude des tissus cérébraux
- Remplacement :

La souris est une espèce de choix pour étudier le système nerveux central des Vertébrés qui permet d'obtenir des informations en grande partie transposables chez l'Homme. Ce projet vise à comprendre les mécanismes à la base d'une fonction cognitive complexe : la formation des traces mnésiques olfactives à l'échelle du cerveau entier. Le cerveau doit donc être intact pour que les connexions entre les différentes régions cérébrales soient préservées et que nous puissions étudier leurs activations coordonnées. De plus, nous étudions les circuits neuronaux chez le sujet en train d'apprendre : il nous faut donc travailler avec des animaux vigiles. Il nous est donc impossible de conduire cette étude *in vitro* sur des cultures de neurones dissociés. Enfin, dans l'état des connaissances actuelles, les questions que nous adressons ne peuvent malheureusement pas être réalisées *in silico*.

- Réduction :

Le nombre total d'animaux requis pour ce projet est de 800 souris sur 5 ans. Ce nombre sera réduit au minimum grâce aux techniques d'enregistrement utilisées qui permettent de collecter un grand volume de données sur plusieurs jours. Ce nombre sera réduit davantage grâce à nos études pilotes qui permettront une optimisation des paramètres de nos expériences. De plus, nous utiliserons des animaux identiques sur le plan génétique, de manière à limiter davantage la variabilité de nos résultats. Enfin, comme nous pourrons enregistrer l'activité des neurones sur plusieurs jours, un animal pourra être son propre contrôle : nous alternerons les conditions « test » et « contrôle » d'une session à l'autre avec les mêmes souris, plutôt que d'utiliser deux groupes de souris pour chacune des conditions. Cette approche permettra de réduire considérablement le nombre de souris.

- Raffinement :

Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels : petits groupes sociaux (maximum 5 souris par cage) au moins jusqu'à l'étape de chirurgie, cages enrichies d'éléments permettant de construire un nid (carré de coton, petites maisons en carton, frisures de papier kraft) ou de favoriser l'exploration (jouets). L'enrichissement des cages soulagera le stress lié à l'isolement parfois nécessaire des souris suite aux chirurgies. Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement selon des critères objectifs. Chaque souris sera habituée à l'expérimentateur et à l'enceinte de test, pendant au moins 3 jours avant le début des tests, pour limiter le stress des manipulations. Une fiche de suivi individuel sera créée pour chaque procédure expérimentale. A partir des critères définis dans ces fiches, des points limites précoces seront établis pour éviter de prolonger toute souffrance.

La mise à mort des animaux en fin d'expérimentation sera nécessaire pour prélever leur cerveau et faire l'analyse post-mortem des tissus cérébraux. Cette procédure sera réalisée par des expérimentateurs compétents et soucieux du bien-être animal, sous anesthésie profonde avec le degré d'analgésie recommandé par les services vétérinaires. La mise à mort sera ainsi indolore pour les animaux, avec une perte de conscience rapide.

13969 Des données de plus en plus nombreuses indiquent que nombre de protéines impliquées dans le développement tumoral sont également des régulateurs importants du métabolisme. Notre projet vise à comprendre les fonctions métaboliques de 3 acteurs importants de la tumorigenèse: p53, MDM2 et E4F1. Un des projets de notre laboratoire est d'évaluer le rôle de ces acteurs dans le tissu adipeux (TA). On distingue classiquement deux types de TA: les TA blancs, et le TA brun. Ces 2 types de TAs ont des rôles métaboliques différents. Nos études précédentes ont essentiellement porté sur le rôle de ces acteurs dans le fonctionnement du tissu adipeux blanc. L'objectif de cette nouvelle étude est de déterminer, pour la première fois, leurs rôles dans le fonctionnement du TA brun, Pour répondre à cette question, nous utiliserons différents modèles murins génétiquement modifiés permettant l'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes dans le TA brun. Nous évaluerons à la fois les effets directs de l'inactivation de ces gènes dans le TA brun mais également les conséquences métaboliques indirectes sur d'autres tissus tels que le foie, les muscles, ou le pancréas. Les animaux analysés seront soumis à des changements environnementaux permettant

de mesure l'activité du TA brun, incluant une exposition au froid ou à un régime hypercalorique riche en graisses.

Les tests réalisés sur ces groupes expérimentaux seront réalisés dans le respect strict de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu d'utiliser un nombre minimum mais suffisant d'animaux pour garantir la puissance statistique de nos résultats expérimentaux. La planification des expériences est organisée de manière à réduire le nombre d'animaux en évitant la répétition des groupes contrôles indispensable à la validation des résultats mais aussi en analysant les animaux inclus dans nos groupes expérimentaux de la façon la plus exhaustive possible. Ainsi, plusieurs tests métaboliques seront réalisés sur chaque animal avant le sacrifice final afin d'en limiter le nombre. Afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, nous avons évalué à 600 le nombre maximum de souris nécessaires à notre étude.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption): Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un travail de raffinement continu dans le but d'améliorer les conditions d'élevage associé à une procédure de suivi du bien-être animal adaptées aux expériences, incluant un suivi quotidien par la structure de bien être animal de notre établissement. Nous proposons aussi d'enrichir l'environnement des souris afin d'améliorer les conditions d'élevage (litière mélangée à des copeaux et briques de peuplier). Les points limites de cette série d'expérimentations seront une perte de poids rapide (20% en quelques jours), la prostration, un pelage hirsute, le dos rond, l'accroissement rapide d'une ou plusieurs masses pouvant présager d'un développement de tumeurs ou tout autre signe clinique, jugé par le technicien expérimenté, comme indiquant un état moribond. Une attention particulière sera portée aux animaux qui seront prédisposés au développement tumoral du fait des manipulations génétiques subies.

« Remplacer » les modèles animaux : Il n'existe à ce jour aucun modèle d'étude *in vitro* permettant de modéliser la complexité des interactions métaboliques à distance entre tissus. De fait, cette étude doit obligatoirement être réalisée chez l'animal.

13970 Avec plus de 650 millions de personnes touchées dans le monde en 2016, l'obésité est devenu un problème de santé majeur. Les patients obèses ont un risque accru de développer des complications chroniques telles que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancer. Traiter l'obésité réduirait considérablement l'incidence de toutes les maladies qui y sont associées. Malheureusement, les traitements actuels ne sont pas suffisamment efficaces, et les régimes ou les exercices physiques n'entraînent souvent qu'une perte de poids temporaire, suivie très souvent d'un retour rapide au poids initial à la fin de ces interventions, le soi-disant « effet yo-yo ». Pour envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes biologiques responsables de cette maladie. Le cerveau est un organe d'extrême importance dans ce contexte. Une région particulière, appelée hypothalamus, joue un rôle clé dans la régulation du poids corporel et de la glycémie. Un nombre significatif de sujets obèses présentent une activité fonctionnelle altérée au niveau de leurs neurones hypothalamiques, et une telle activité neuronale altérée est particulièrement observée dans un groupe de neurones hypothalamiques appelés « neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) ».

Cette activité altérée des neurones POMC est considérée comme un « signe distinctif » de l'obésité, qui prédispose les sujets à accumuler de la masse grasse. De plus, ce dysfonctionnement neuronal expose probablement les patients obèses à un risque accru de développer un diabète de type 2 et des complications cardiovasculaires. Malheureusement, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents contribuant à l'activité altérée de ces cellules cérébrales restent largement inconnus. Ainsi, l'objectif de notre projet est d'identifier les principaux facteurs moléculaires altérés de l'obésité au niveau des neurones POMC hypothalamiques. Nous pensons que nos recherches pourraient donc ouvrir la voie à une génération de médicaments capables de corriger l'activité de ces cellules neuronales afin de lutter contre l'obésité et les maladies métaboliques qui y sont associées.

Au total, nous utiliserons un maximum de 230 souris sur 5 ans. La souris est le modèle de choix pour notre projet car elle permet d'étudier des individus génétiquement modifiés dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'homme. Ainsi, nous pourrions obtenir des informations pertinentes sur le plan médical. De plus, les mécanismes biologiques étudiés impliquent un processus de communication entre le cerveau et le reste du corps. Un tel processus de communication est crucial pour la régulation du poids corporel et de la glycémie. Par conséquent, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme vivant entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut remplacer nos modèles murins. Conformément au principe des 3R, nous avons cependant optimisé les protocoles afin de minimiser le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistiques ont été utilisés pour prévoir avec précision le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Une attention particulière sera accordée au bien-être des animaux. Un suivi précis du poids et de la prise alimentaire de chaque souris nécessite l'isolement de l'animal. Les souris seront hébergées dans des cages individuelles dans une pièce réservée dans laquelle la température, l'humidité et la lumière y sont régulés. Le manque d'interaction sociale au sein de la cage sera compensé par un enrichissement des cages. Les cages qui seront utilisées sont transparentes et elles seront placées les unes à côté des autres de manière à ce que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec d'autres animaux. Avant chaque expérience, les animaux seront manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs, réduisant ainsi leur stress.

13971 Les maladies neurologiques souffrent d'une absence de prise en charge thérapeutique. Bien que de nombreuses cibles novatrices soient proposées, l'étude de leur intérêt thérapeutique est souvent limitée par l'existence d'une barrière physiologique entre le cerveau et le sang qui réduit fortement la possibilité d'agir sur ces cibles à l'aide de molécules et macromolécules (telles que les biothérapies). Nous développons de nouvelles méthodes de vectorisation de ces molécules c'est-à-dire que nous les couplons à un système spécifique des barrières physiologiques qui doit permettre leur passage au travers de cette barrière hémato-méningée.

Ce projet permet dans un premier temps de valider la pertinence d'une cible thérapeutique en agissant directement sur celle-ci au niveau du cerveau (via l'administration d'agents pharmacologiques dans le cerveau), puis dans un second temps de valider l'efficacité des molécules vectorisées en les administrant par des voies systémiques classiques. Ces validations sont faites par des mesures de paramètres biologiques et comportementaux (tels que l'activité locomotrice) et par des dosages de biomarqueurs dans les fluides et les organes d'intérêt. Ces études sont pratiquées chez les rongeurs. Le choix entre le rat et la souris est fonction de la cible étudiée, et des éventuels modèles de pathologie dans lesquels les composés seront étudiés par la suite. En effet on privilégiera l'usage de la même espèce dans les 2 cas afin de réduire au strict nécessaire les études dans les modèles pathologiques.

Les administrations dans le cerveau sont faites sous anesthésie et analgésie. Les volumes administrés sont adaptés à la physiologie des animaux. Les administrations par voie périphérique sont faites selon les standards de l'art vétérinaire. L'effet sur les cibles biologiques et l'activité des composés sont étudiés en cours d'essai par des mesures de paramètres biochimiques classiques dans le sang (ex : glycémie) et/ou les urines et les feces, et par des mesures comportementales dans des tests d'évaluation du comportement spontané, ne nécessitant pas de stimulation aversive. En fin d'étude les biomarqueurs d'activité peuvent être étudiés par des dosages dans le sang, éventuellement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans les organes d'intérêt. Le LCR est prélevé sous anesthésie. Les organes sont prélevés en fin d'étude après euthanasie des animaux. L'intérêt des cibles biologiques et la capacité des molécules à agir sur ces cibles sont évalués dans un premier temps *in vitro* dans des modèles cellulaires, organotypiques ou biophysiques. Ces modèles permettent de sélectionner les meilleurs candidats médicament. Cependant, ces modèles ne permettent pas de prendre en compte la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, en particulier la coexistence de plusieurs barrières physiologiques et les différentes voies de métabolisme. De plus ils ne permettent pas de corrélérer une action sur une cible biologique

et la mesure d'un biomarqueur et/ou d'un paramètre clinique. La validation complète de ces nouvelles cibles et des candidats médicament ne peut être faite qu'avec des modèles *in vivo*.

Le nombre d'animaux utilisés dans ces études de pharmacologie se limite au strict nécessaire pour atteindre l'objectif scientifique : ce nombre est déterminé en fonction des données de la littérature scientifique et des analyses biostatistiques réalisées par un expert. En utilisant à la fois des mesures cliniques, comportementales et biochimiques dans les fluides et tissus biologiques on réduit le nombre d'animaux nécessaires à la caractérisation complète des cibles et composés étudiés.

La manipulation des animaux, les techniques d'administration et de prélèvement sont réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les tests comportementaux retenus n'induisent pas de stress notable. Dans ces conditions, ces différents gestes peuvent provoquer un inconfort léger et de courte durée.

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec de l'enrichissement et des interactions quotidiennes avec le personnel. De plus des points limites spécifiques sont identifiés afin de limiter la contrainte liée aux phases de chirurgie.

Le nombre maximal d'animaux utilisés dans ce projet sera de 4000 souris et 1000 rats sur une période de 5 ans.

13972 Les maladies cardiovasculaires, notamment les pathologies touchant les vaisseaux sanguins, demeurent encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Malgré le développement de nouvelles techniques chirurgicales et peu invasives, la revascularisation des artères pose encore problème. Il existe une importante demande clinique en nouvelles prothèses vasculaires synthétiques et durables.

Les prothèses synthétiques sont performantes pour la revascularisation des artères de moyen et gros calibres, mais donnent des résultats médiocres lorsqu'il s'agit de revasculariser des artères de petit calibre (< 6 mm, ex. coronaires, artères périphériques).

L'objectif de cette étude est d'évaluer des biomatériaux comme prothèse vasculaire pour le remplacement de vaisseaux pathologiques de petit diamètre. La prothèse vasculaire doit supporter la chirurgie ainsi que les conditions hémodynamiques qui s'exercent sur la paroi vasculaire *in vivo* (contraintes mécaniques et variations de pression). Les propriétés mécaniques de la prothèse doivent être proches de celles du vaisseau receveur afin de limiter les perturbations dû au flux sanguin. Nous souhaitons déterminer le devenir de ces prothèses dans un modèle de remplacement vasculaire chez le rat, au cours du temps : vérifier son intégration, sa dégradation et sa colonisation par les cellules de l'hôte.

L'intervention sur des rats sera réalisée sous anesthésie générale (anesthésie gazeuse + analgésique). Un segment de l'aorte sera alors remplacé par une prothèse vasculaire. Nous allons suivre la perméabilité des prothèses (vérifier que les prothèses ne sont pas bouchées) à 7 jours, 1 mois, 3 et 6 mois post implantation. La perméabilité sera évaluée par l'imagerie IRM (imagerie par résonance magnétique) suivi par une évaluation histologique.

Cette étude a été conçue dans le respect du bien-être animal en appliquant la règle des 3 R :

Remplacer : devant la complexité physiologique de la thrombose, l'évaluation de la perméabilité des prothèses ne peut s'apprécier que sur modèle animal. Actuellement aucun modèle *ex vivo* ne peut simuler cet évènement.

Raffiner : l'acquisition des images *in vivo* n'étant pas douloureuse, l'animal est maintenu sous anesthésie gazeuse légère uniquement pour limiter ses mouvements et son stress. Après l'intervention chirurgicale, les animaux sont surveillés jusqu'à la phase de réveil puis tous les jours par du personnel bien formé. Une injection sous cutanée d'un analgésique sera réalisée pour réduire la douleur.

Une grille d'évaluation de la douleur (points limites sont stricts, adaptés et précoces), tout au long de l'étude, a été mise en place et si l'animal atteint un certain score, il recevra une injection sous cutanée d'un analgésique, au-delà, l'animal sera euthanasié.

Réduire : le nombre minimum d'animaux à utiliser a été déterminé d'après un test statistique (test de Kruskal-Wallis) prenant en compte la variabilité biologique inter-individuelle et les risques dus à la chirurgie. Un nombre de 10/12 animaux par groupe est nécessaire pour assurer des résultats statistiquement pertinents. Ne seront implantées que les prothèses qui répondent, *in vitro*, aux bonnes propriétés mécaniques (supporter une pression, résister à la suture) ce qui participe aussi à la réduction du nombre d'animaux.

Cette étude nécessite l'utilisation de 328 rats sur 5 ans. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de l'expérience.

13973 Notre projet s'intéresse à la détection des atteintes hépatiques de façon précoce. La stratégie est de développer un biomarqueur permettant de détecter toutes les dysfonctions hépatiques suivant leur sévérité et ce à des stades même asymptomatiques. En effet, la cirrhose hépatique représente la principale indication des transplantations hépatiques. Elle est également l'une des principales causes de décès prématuré (avant 65 ans) en Europe. Elle serait responsable d'environ 10 décès pour 100.000 habitants. L'évolution des atteintes hépatiques est souvent silencieuse avant l'arrivée de la cirrhose. Le diagnostic actuel des stades avancés des atteintes hépatiques se base principalement sur l'exploration biochimique de la fonction hépatique, sur des arguments cliniques et, dans certains cas, sur la biopsie hépatique. Les tests biochimiques disponibles à l'heure actuelle manquent de sensibilité et de spécificité et ne permettent pas un diagnostic précoce des atteintes hépatiques. Ceci justifie la recherche et le développement de nouveaux biomarqueurs capables de mettre en évidence une atteinte hépatique de façon précoce.

Des études récentes montrent que, chez les patients cirrhotiques, l'albumine présente des modifications chimiques et structurales et que ses modifications varient en fonction de la sévérité de la maladie. Il existe donc une relation très importante entre les atteintes hépatiques et la structure tridimensionnelle de l'albumine ainsi que les modifications chimiques de cette protéine.

Notre objectif est donc d'étudier le pouvoir prédictif des modifications de l'albumine tout au long du développement des lésions hépatiques, jusqu'à la cirrhose. L'approche expérimentale sera de développer par différents mécanismes, des modèles animaux d'atteintes hépatiques afin d'analyser les modifications structurales détectables en fonction de l'étiologie et de la sévérité des lésions. Afin de couvrir différents mécanismes d'atteintes hépatiques menant à la cirrhose nous proposons l'utilisation de modèles d'insuffisances hépatocellulaires chez des rats. Nous évaluerons : (1) l'évolution du profil d'expression des modifications structurales de l'albumine sur les échantillons de plasma obtenus en utilisant la spectrométrie de masse, (2) nous réaliserons en parallèle un bilan biochimique classique (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, gamma-glutamyl-transpeptidase, bilirubinémie, albuminémie), puis (3) des coupes histologiques du foie.

Ce projet nécessite l'utilisation de 232 rats dans l'objectif de mimer deux types d'atteintes hépatiques : aiguës et chroniques.

Ce projet répond aux exigences des 3R, à savoir :

-Remplacer : les modèles *in vitro* utilisant des cellules hépatiques ne produisent pas des quantités suffisantes d'albumine permettant une analyse sensible et robuste et ne suffisent pas à eux seuls pour modéliser et prédire la complexité de l'organe. Les modèles animaux sont la seule alternative permettant de suivre en parallèle l'évolution biochimique et histologique de l'atteinte hépatique et de la corrélérer à la présence des biomarqueurs d'intérêts.

-Réduire : Nous utilisons des techniques de dosages performantes et très sensibles permettant de détecter de très faibles variations des paramètres biologiques mesurés. Le matériel biologique obtenu pour chaque rat, permettra de réaliser l'analyse des modifications de l'albumine, les tests biochimiques classiques et des analyses histologiques afin d'objectiver l'atteinte hépatique. Des banques d'organes seront constituées à partir des échantillons collectés afin de pouvoir compléter les analyses dans le futur. De plus, le développement et l'utilisation rationnelle de modèles animaux est parfaitement maîtrisé par les personnes impliquées dans ce projet. Le nombre de rats par lots est réduit à 8 ce qui est le minimum pour des interprétations statistiques fiables dans notre modèle expérimental.

-Raffiner: les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, changement régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. Un suivi quotidien du poids et de l'état général permettra de détecter l'apparition de signes de souffrance chez les rats, conduisant éventuellement à leur exclusion du protocole. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux.

En conclusion, ce projet permet d'envisager des bénéfices importants dans le diagnostic précoce des atteintes hépatiques, grâce à la détection de biomarqueurs sanguins spécifiques.

13974 Notre centre est une unité de service spécialisée dans la génomique fonctionnelle de système immunitaire aidant la communauté de la recherche biomédicale à disposer de modèles précliniques permettant de comprendre le rôle de la fonction des gènes dans les pathologies humaines (inflammation, infection, cancer).

Nous générons, hébergeons, développons et maintenons des modèles « souris », dans nos locaux, pour nos collaborateurs. Tous les animaux en zone d'élevage chez nous, sont uniquement présents pour établir des animaux d'intérêts qui seront ensuite restitués aux unités utilisatrices pour entrer en phase expérimentale dans leur unité, dans un projet de recherche déposé par leur soin, sur leur propre agrément.

Pour comprendre les fonctions de l'ensemble de nos gènes, il est nécessaire de générer, analyser et caractériser des modèles de souris génétiquement modifiées.

L'utilisation de rongeurs logés en groupe dans de nombreux domaines de la recherche biomédicale impose le besoin d'identifier les individus dans une cage. Quelques études ont été publiées pour évaluer les effets négatifs possibles des méthodes d'identification des souris nouveau-nées sur leur développement et leur bien-être. La résection de la dernière phalange sur des souriceaux s'est avérée efficace pour le marquage à long terme des animaux individuels et les souris nouveau-nées ont montré la réaction la plus faible avec cette méthode.

Il est important de noter que le tissu d'orteil coupé s'est avéré suffisant pour le génotypage. Cette procédure d'identification et de génotypage individuelle des nouveau-nés n'a révélé aucune différence globale et constante dans le développement des réflexes somatiques et neurologiques au cours de la période postnatale. De plus, cette méthode n'a pas entravé de façon significative le comportement normal général des animaux adultes (p. ex. capacité de se déplacer, de saisir, de grimper) et les fonctions sensorielles et motrices évaluées au moyen d'une batterie simplifiée de tests SHIRPA, ainsi que des tests Rotarod et Elevated Plus Maze. Le poids du thymus post-mortem et du poids des glandes surrénales n'a donné aucune indication de stress chronique à la suite de la méthode d'identification.

Le génotypage des animaux peut être effectué à partir de différents types de prélèvements (coupe de queue, fèces, poils), mais sa mise en œuvre ne présente un intérêt que pour un individu identifié. La résection de la dernière phalange peut techniquement être réalisée sur un souriceau nouveau-né dès l'âge de 5 jours et de façon optimale du 7ème au 10ème jour. Considérant qu'elle fournit également un prélèvement tissulaire exploitable pour le génotypage, elle offre l'opportunité de réaliser une identification et un génotypage tout en n'effectuant qu'une seule intervention précoce sur l'animal.

Cette technique réalisée sur le nouveau-né à l'âge recommandé, est considérée et décrite dans la littérature comme non invasive et non douloureuse, le système nerveux périphérique n'étant pas encore performant (processus de myélinisation en cours) et le processus d'ossification n'étant pas encore établi.

Dans le cadre de nos activités d'élevage et de production d'animaux, nous utilisons cette méthode, recommandée par la FELASA, qui consiste à l'identifier ET géotyper de façon précoce les souris.

Le souriceau, une fois le prélèvement effectué, est remis dans le nid de sa cage d'origine au contact de ses congénères. Nous favorisons le bien-être des animaux en ajoutant de l'enrichissement

(Diamond twist) permettant à la mère la confection du nid, mais également par l'ajout de dôme (Dome hup).

Cette procédure d'identification et de génotypage combinés permet de sélectionner les animaux présentant le génotype recherché de manière précoce (avant sevrage) et ainsi de réduire le nombre d'animaux élevés et limiter les euthanasies tardives. Elle favorise également la constitution précoce de lots d'animaux homogènes, favorisant l'enrichissement social et réduisant ainsi le risque d'agressivité entre les animaux.

C'est notamment pour ces raisons et en l'absence d'effet négatif à court et long terme sur le comportement ou le bien-être des animaux que cette technique est actuellement recommandée par des groupes d'experts européens.

Nous garantissons à nos animaux les meilleures conditions d'élevage, les paramètres d'environnement, au même titre que nos souris, sont contrôlés quotidiennement. Nous respectons les densités d'animaux par cage, maîtrisons les paramètres physiques tels que, la température, l'hygrométrie, renouvellement d'air, pression et cycle nyctéméral. Tous ces paramètres sont commandés par une GTA avec des renvois d'alarme 7/7 jours en cas de variabilité des seuils programmés. L'alimentation en pellets et en eau est distribuée ad libitum. Le système de distribution d'eau est automatisé, nous réalisons une filtration par osmose inverse et l'ensemble de la machinerie est contrôlé informatiquement avec également des retours d'alarme 7/7 jours en cas de variation de nos paramètres.

Pour l'identification et le génotypage des lignées produites chaque année et le développement de celles-ci, qui font l'objet de cette demande d'autorisation, nous estimons le nombre d'animaux dans ce projet à 240 000 souris maximum pour les 5 ans du projet.

L'ensemble des pratiques mises en œuvre au sein de notre unité se fait avec le consentement de notre vétérinaire ainsi que les vétérinaires référents de nos tutelles afin de garantir la bonne mise en application de la réglementation en vigueur, la formation des personnels soignants et le respect de la règle des 3R.

13975 L'efficacité des thérapies anticancéreuses est liée à l'accumulation des agents thérapeutiques dans le tissu néoplasique, soit qu'on parle de petites molécules ou de nanoparticules. La perméabilité des vaisseaux sanguins tumoraux aux nanoparticules et leur persistance dans la circulation sanguine sont deux paramètres qui influencent l'accumulation des nanoparticules dans le tissu tumoral. Cependant, des études combinées qui exploitent ces deux mécanismes manquent encore. Les nanoparticules magnétiques peuvent être accumulées dans ou à proximité de la tumeur en réponse à un champ magnétique externe (un aimant permanent). L'objectif de notre projet est d'étudier la biodistribution et l'accumulation tumorale de différentes classes de nanoparticules magnétiques (magnétosomes, liposomes ultra-magnétiques, nanofleurs et nanocubes d'oxyde de fer), sélectionnées pour leurs atouts clefs pour un « tumor homing » optimal (taille, enrobage, magnétisation) et de quantifier l'effet du ciblage magnétique. De plus, il apparaît fondamental de comparer deux modèles tumoraux de cancer de la prostate, plus ou moins fidèles à la pathologie humaine : les mêmes cellules cancéreuses seront implantées dans leur emplacement anatomique habituel, c'est à dire dans les lobes prostatiques (modèle orthotopique), ou en sous-cutané (modèle hétérotopique). Ces deux modèles ont une vascularisation et une perméabilité différentes et, tandis que le modèle sous-cutané est très utilisé, car plus facile à réaliser, celui orthotopique se reproche beaucoup plus à la réalité et il devrait être plus prédictif de l'efficacité clinique du ciblage magnétique.

L'absence de toxicité des nanoparticules utilisées et leur niveau d'internalisation cellulaire sera systématiquement validée d'abord sur des cellules en culture avant d'être testé sur des animaux. Cela permettra d'éviter l'utilisation des animaux dans tous les cas où un effet net de toxicité sera mesuré *in vitro*. L'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes de ciblage tumoral et de ce fait ils ne peuvent être remplacés. Après l'injection des cellules tumorales prostatique d'origine murine dans les différents sites d'implantation, nous utiliserons des techniques d'imagerie ultra-sonore qui permettent de réaliser un suivi non invasif

dans le temps sur un même animal de la croissance tumorale ainsi que du niveau de vascularisation de la tumeur, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'étude. Les animaux seront hébergés en fratrie dans le respect de leur bien-être avec un enrichissement du milieu fourni par l'animalerie. Dans le cas de l'acte chirurgical d'implantation dans la prostate, une analgésie sera mise en place avant la chirurgie avec un suivi postopératoire quotidien. Au moindre signe de souffrance ou de mal être de l'animal l'expérimentation sera stoppée.

Une fois atteinte la taille et la vascularisation souhaitées, les nanoparticules seront injectées par voie intraveineuse en présence ou en absence d'aimant au niveau tumoral.

Un nombre minimal mais statistiquement correct d'animaux par groupe sera choisi pour réduire le nombre total d'animaux utilisés. De plus, les contrôles seront mutualisés entre les différentes expériences, et les analyses *ex vivo* seront réalisés en sorte de pouvoir faire toutes les mesures nécessaires (techniques différentes) sur un même organe.

Toutes les expériences *in vivo* seront gouvernées par les principes de réduction, raffinement et remplacement des animaux.

Afin de réduire la douleur et la détresse des animaux, une anesthésie (par voie gazeuse ou injectable) sera toujours pratiquée pour chaque procédure, et l'hébergement, les soins et l'ensemble des procédures expérimentales sur les animaux seront effectuées dans le respect du bien-être animal avec la définition des points limites au-delà desquels l'expérience sera interrompue.

En prenant en compte toutes ces considérations, le nombre d'animaux nécessaires à cette étude est de 312 souris :

- 96 modèles sous-cutanés injectés (16 lots de 6 souris)
(4 nanoparticules × 2 concentrations × 2 vascularisations)
- 12 modèles sous-cutanés de contrôle (2 lots de 6 souris)
(2 vascularisations)
- 192 modèles prostatiques injectés (32 lots de 6 souris)
(4 nanoparticules × 2 concentrations × 2 vascularisations × 2 présence ou absence d'aimant)
- 12 modèles prostatiques de contrôle (2 lots de 6 souris)
(2 vascularisations)

13976 Les IgA sont l'isotype d'anticorps majoritairement produit par les muqueuses ; leur concentration dans le sérum est la plus importante après celle des IgG. Elles ont une activité protectrice au niveau des muqueuses. Elles protègent contre les microorganismes pathogènes ; de plus elles ont la capacité de façonner le microbiote intestinal. Les IgA ont traditionnellement été considérées comme des anticorps ayant une activité anti-inflammatoire, participant au processus de tolérance orale. En dépit d'une stimulation permanente et intense au niveau digestif elles évitent une inflammation chronique. Cette activité immuno-suppressive dépasse le seul cadre digestif, en effet les patients ayant un déficit en IgA développent une inflammation intestinale mais aussi des manifestations de maladies auto-immunes. Dans cette étude, notre objectif est d'explorer le rôle immuno modulateur des IgA dans un modèle de souris développant spontanément une maladie auto immune ressemblant au lupus érythémateux disséminé (LED) chez l'homme. Ces souris croisées avec des souris qui expriment l'IgA et l'IgG humaine sont utilisées. Elles seront suivies pendant 12 mois afin de regarder le développement de la maladie en évaluant les paramètres suivants: taux d'immunoglobulines totales, taux d'anticorps auto-immuns, protéinurie, créatininémie et lésions rénales.

Cette étude utilise au total 295 souris. Le projet répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier médiée par l'IgA ainsi que de son activité anti-inflammatoire dans le cadre d'une maladie auto-immune, le lupus. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques envisageant l'utilisation thérapeutique de l'IgA humaine dans le traitement de maladies auto-immunes chez l'Homme. Le modèle murin de lupus érythémateux disséminé appelé MRL/lpr

utilisé dans cette étude est bien caractérisé et permet de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : l'utilisation des modèles murins dans cette étude est maîtrisée par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques et les croisements envisagés entre les différentes lignées de souris permettent de réaliser une étude pertinente des propriétés anti-inflammatoires de l'IgA.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, euthanasie dès la manifestation du moindre signe de souffrance).

13977 Même si, à ce jour, il reste très difficile de discerner avec certitude le(s) polluant(s) majoritairement impliqué(s) dans l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique, les résultats de nombreuses études expérimentales et épidémiologiques supportent le rôle clé joué par la fraction particulaire, et plus particulièrement par les particules fines (PM_{2.5}) à défaut d'éléments à ce jour suffisants à l'égard des particules ultrafines (PUF).

L'objectif de ce projet consistera à apporter des éléments novateurs sur la toxicocinétique et la toxicodynamie des PUF et l'utilisation des miARN circulants comme indicateurs d'exposition ou d'effets. Des PUF seront donc administrées de manière subchronique (90 jours) à un modèle murin afin d'étudier :

- Leur distribution dans des organes-cibles 24 heures après la dernière exposition.
- Leur potentiel oxydant et leur capacité à induire des lésions oxydatives, inflammatoires et mitochondriales dans ces mêmes organes cibles.
- Les modifications des profils d'expression des miARN circulants induites et la contribution des différents organes cibles à ces dernières.
- Les effets organo-spécifiques des modifications des profils d'expression des miARN par les PUF sur l'activation de voies de signalisation impliquées dans le remodelage tissulaire voire la cancérogenèse.

De par ses objectifs spécifiques, ce projet requiert l'utilisation d'un modèle animal. En effet, les modèles cellulaires disponibles à ce jour n'apportent toujours pas, à eux seuls, de réponses satisfaisantes aux questions préalablement posées. Le modèle animal choisi sera la souris BALB/c, mâle, âgée de 8 semaines à réception, et de statut sanitaire « specific opportunistic and pathogen free » (SOPF), selon la liste proposée par la « Federation of european laboratory science associations » (FELASA). Cette lignée de souris est décrite comme moyennement sensible au développement des pathologies, et notamment des cancers, en réponse à un stress chimique.

Les expérimentations animales nécessaires à l'exécution de ce projet de recherche s'inscriront en conformité avec la Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale et avec la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). En effet, ce projet *in vivo* s'inscrivant dans la continuité de projets réalisés sur des modèles cellulaires, d'une part, et murins, d'autre part, ses objectifs seront raffinés et le nombre d'animaux à utiliser réduit (216 souris au total). Trois lots de souris (72 souris/lot) seront nécessaires : un lot sera utilisé comme contrôle négatif et deux autres exposés à des doses croissantes de PUF. Les précédentes études *in vivo* ont contribué à raffiner le protocole d'exposition utilisé en indiquant les doses de PUF et la cinétique à respecter.

L'exposition des souris aux PUF sera réalisée, après anesthésie légère à l'isoflurane, à raison de 3 instillations intranasales/semaine pendant 12 semaines, soit 36 instillations intranasales au total,

de la suspension de PUF diluée dans une solution saline aux deux concentrations à tester (10 et 20 µg/40µL). Les souris témoins ne recevront que la solution saline. Le protocole d'exposition de ce modèle murin, pendant 12 semaines, par instillation intranasale, assure une distribution pulmonaire homogène des PUF et provoque une inflammation et un remodelage tissulaire pulmonaires, observés au niveau moléculaire, cellulaire et histologique.

Toutefois, de par l'hétérogénéité des PUF collectées et donc des expositions réalisées, les effectifs de chaque lot devront être suffisamment importants afin de limiter la variabilité intra-lot. Ainsi, 24h après la dernière exposition, les souris seront anesthésiées (xylazine/kétamine) puis sacrifiées comme suit : 36 souris (12 souris/lot) seront dédiées aux observations anatomopathologiques sur les différents organes cibles, 36 autres (12 souris/lot) aux observations en microscopies optique et électronique, 36 autres (12 souris/lot) aux dosages des métaux dans les différents organes cibles, 72 autres (24 souris/lot) à l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents (6 souris/lot, respectivement pour étude du stress oxydant, de l'inflammation, de la mort cellulaire, et du transcriptome et des voies de signalisation).

13978 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot, comme l'amyotrophie spinale infantile (ASI) sont toutes deux des maladies neurologiques incurables qui affectent les neurones moteurs de la moelle épinière et/ou du cerveau responsables de la motricité. La SLA et l'ASI se manifestent par une perte graduelle des fonctions musculaires et évolue rapidement vers une paralysie générale. La SLA touche environ 8000 personnes en France et se déclare dans la majorité des cas entre 50 et 70 ans. L'ASI concerne environ 1 naissance sur 6000, et présentent 4 différentes formes qui touchent des enfants ou des adultes. Bien que les neurones moteurs soient sélectivement atteints dans la maladie, les astrocytes, les cellules nourricières partenaires actifs des neurones, présentent des anomalies fonctionnelles qui contribuent au processus dégénératif. Les cellules du système immunitaire se retrouvent également dans le système nerveux et participent au processus dégénératif. L'ensemble de ces défauts contribue à générer un contexte inflammatoire chronique, dit "neuroinflammatoire" particulièrement dangereux pour le système nerveux. Notre objectif est de comprendre la relation complexe existant entre les motoneurons et leur environnement et de développer au regard de cette compréhension de nouvelles thérapies. Nos deux principales questions sont 1. Quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à la perte des motoneurons dans le cadre d'un environnement cellulaire inflammatoire et délétère ? Quelles sont les options thérapeutiques envisageables ? Au delà de certaines spécificités pathologiques cliniques des SLA et ASI, notre ultime objectif est de définir des mécanismes communs à ces deux pathologies afin de définir des thérapies applicables à un plus grand nombre de cas et potentiellement d'autres pathologies du système moteur.

Afin d'aborder cette problématique, nous disposons de modèles murins expérimentaux *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de la SLA et ASI. Ces souris, qui présentent une atrophie musculaire progressive, ne présentent pas de signes de douleur chronique, comme il est également documenté dans les pathologies humaines. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, la règle des « 3R » est appliquée et des solutions alternatives à l'expérimentation animale sont mises en place: l'alternative à l'expérimentation animale est activement encouragée par l'utilisation des cultures primaires de neurones et de cellules non-neuronales (cellules gliales ou cellules du système immunitaire) ainsi que des cultures organotypiques de moelle épinière (*ex vivo*). Nous avons non seulement besoin de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les expériences, mais aussi de réduire leur inconfort et douleur. Le raffinement expérimental sera observé avec des installations réservées aux animaux conformes aux réglementations nationales et de l'UE. Cela garantit que le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire pour le projet et que les normes de soins des animaux et d'élevage sont maintenues.

L'ensemble des procédures expérimentales implique un suivi rigoureux des animaux afin de réduire toute souffrance : les injections d'anesthésique, la manipulation ou les prélèvements sanguins suivent la réglementation et les recommandations en vigueur. Au-delà de la surveillance des animaux jusqu' à la fin de l'expérience des mesures pré/per et post -opératoires sont prises :

utilisation de gel oculaire, tapis chauffant, injection de solution glucose/saline, utilisation d'analgésique.

Nous avons déterminé pour une durée du projet de 5 années, un nombre total de 1375 souris. Nous réalisons afin d'explorer les capacités motrices des souris des tests d'exploration fonctionnelle non-invasifs. Concernant nos conditions d'hébergement : la température et l'hygrométrie sont contrôlées, les locaux sont en légère sur-pression, couvercles filtrants, suivi quotidien des animaux, enrichissement du milieu (copeaux, igloos en plastique, bâtonnets de cellulose).

13979 La chirurgie maxillo-faciale est une discipline variée prenant en charge le squelette facial (troubles de position des mâchoires, fractures, kystes et tumeurs...) et les parties molles (chirurgie plastique, réparatrice et esthétique du visage). La greffe osseuse du sinus maxillaire a commencé à la fin des années 70 en utilisant un greffon autogène d'origine iliaque. Par la suite, des matériaux variés d'origine humaine (allogreffes), animale (xénogreffes), ou encore synthétiques. Aujourd'hui, le développement d'une nouvelle thérapie cellulaire combinant biomatériaux et des cellules souches orales pour la reconstruction osseuse mandibulaire est une solution d'avenir.

L'objectif primaire de cette étude est d'évaluer la capacité des cellules progénitrices dérivées de la muqueuse orale à favoriser la cicatrisation de défauts tissulaires. Ces défauts concerneront deux types de tissus : cutané et osseux. Dans cette optique, des plaies standardisées de la peau et de la muqueuse palatine seront réalisées à l'aide de punch à biopsie. Simultanément, des défauts osseux seront réalisés au niveau de la mandibule. Ces défauts résulteront de l'extraction de prémolaires et de l'os les entourant afin d'être le plus fidèle aux défauts osseux rencontrés en chirurgie orale.

Les objectifs secondaires seront : évaluer le potentiel de cicatrisation « spontanée » des sites étudiés, comparer diverses sources cellulaires dans leur capacité de cicatrisation, évaluer le rôle respectif des cellules greffées et des cellules hôtes au cours des étapes de la cicatrisation.

Pour mener à bien ces objectifs, le mini-cochon sera utilisé comme modèle animal en raison de la similarité des physiologies osseuses et muqueuses avec celle de l'homme. Sa petite taille à l'âge adulte ainsi que son régime alimentaire omnivore et sa dentition très similaire à l'humain en font un excellent modèle pour les études en chirurgie maxillo-faciale.

Deux séries d'expériences seront réalisées. La première aura pour but d'affiner la mise au point des différents défauts et de récupérer les différents types cellulaires (progéniteurs gingivaux, fibroblastes dermiques, progéniteurs osseux issus de la moelle osseuse). Des mises au point ont permis d'affiner leur amplification, leur transfection par de la GFP et leur association avec un support pour les greffes.

Une fois cette première série d'expériences réalisées, la seconde série d'expériences consistera à effectuer des greffes autologues des cellules récupérées lors de la réalisation des défauts osseux. Ainsi, deux mois après la réalisation du défaut osseux, ces derniers seront greffés avec soit le support seul, soit support + progéniteurs gingivaux, soit support + progéniteurs osseux de la moelle osseuse. Les défauts au niveau de la muqueuse palatine et de la peau seront greffés avec, soit des progéniteurs gingivaux + support (membrane de vicryl rapide), soit des fibroblastes dermiques + support.

A terme, les applications thérapeutiques pourront concerner aussi bien les os que les cartilages ou la dentition, et ainsi bénéficier à des maladies chroniques ou rares (rachitismes génétiques, maladies des os de verre) induisant de grandes pertes osseuses... Cette technique à fort potentiel peut également inspirer des thérapies pour réparer les « gueules cassées », militaires blessés de guerre ou en OPEX, civils accidentés de la route ou des sports à risques...

L'ensemble de ces expériences doit fournir des données pré-cliniques essentielles à la mise en place d'essais sur l'homme.

L'ensemble de cette étude répondra à la règle des 3Rs

Remplacer: De nombreux tests préliminaires in-vitro sur explant ont permis de maîtriser les différents paramètres de la greffe, à savoir le support à utiliser le type cellulaire et la stratégie

d'analyse des résultats. Au terme de ces tests il devient incontournable de passer sur un modèle animal proche de l'humain. Le porc est donc un excellent modèle de par son anatomie proche de l'homme.

Raffiner: L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie générale avec analgésie morphinique. Les soins post-opératoires comprendront une couverture antibiotique ainsi qu'une analgésie sous forme de patch transdermique de fentanyl permettant une diffusion constante. L'hébergement des animaux ce fera en groupe sociaux dans des cages sur caillebotis plastiques pour des raisons d'hygiène. Leur environnement sera enrichi de jouets dédiés type balles à bruit disques à mordre, et de la musique classique sera diffusée 2h par jour au moment du nourrissage.

Réduire: Cette étude sera menée sur 10 mini porcs adultes divisés en deux groupes : un groupe témoin de 2 animaux qui permettra d'évaluer la cicatrisation et la reconstruction osseuse sans greffe de cellules progénitrices et un groupe test de 8 porcs recevant les différents types de progéniteurs. A l'issue de cette étude l'analyse statistique permettra d'obtenir des résultats fiables et d'envisager les premiers essais sur l'homme.

13980 Les travaux menés depuis 15 ans positionnent le microbiote à l'interface entre organismes vivants et leurs environnements et démontrent son influence considérable sur le fonctionnement de multiples voies métaboliques et d'un grand nombre d'organes, intestin, foie, système immunitaire, cerveau, mais aussi poumons, système cardiovasculaire, rein, os. 50% des métabolites circulants seraient issus du métabolisme bactérien. Le microbiote apparaît ainsi comme un déterminant clé au carrefour de la physiologie et de multiples pathologies en attente de progrès thérapeutiques. Il émerge aussi comme une puissante courroie de transmission des changements environnementaux et ceci en interface directe avec notre horloge biologique. En effet, sa composition en bactéries mais aussi la synthèse des multiples molécules issues du métabolisme bactérien varient en fonction du rythme nyctéméral, de l'alimentation, de la prise d'antibiotiques et de l'exposition aux agents infectieux comme aux polluants. Les modifications du microbiote induites par les changements récents de l'environnement humain semblent ainsi un acteur majeur non seulement dans l'épidémie actuelle de maladies métaboliques et inflammatoires chroniques de cancers, mais également dans la survenue de certains cancers et maladies auto-immunes. La compréhension par une approche 'holistique' des effets du microbiote comme des mécanismes qui contrôlent sa composition et son activité métabolique, se révèle donc aujourd'hui indispensable pour mieux appréhender la physiopathologie de nombreuses maladies, améliorer leur prise en charge et leur prévention.

Notre projet vise à mieux définir le rôle du microbiote humain sur le développement des maladies cardiométaboliques. Notre approche consiste à utiliser le modèle murin chez le lequel nous réalisons une transplantation fécale de microbiote humains issue de patients à différents stades des pathologies cardiométaboliques. Nous évaluons ensuite *in vivo* chez les souris receveuse l'impact de ce microbiote sur le développement des facteurs de risque cardiométabolique. Cette approche est couplée à des analyses OMICS (métabolomique, lipidomique, transcriptomique et métagénomique) post-mortem qui permettent d'identifier les facteurs pronostiques diagnostiques portés par le microbiote et impliqués de manière causal dans le contrôle de la glycémie, la cholestérolémie, la prise de poids, la stéatose, l'inflammation et l'athérosclérose. Nous maintenons les lignées normolipidémiques et dyslipidémiques en élevage interne en prenant soin de produire le nombre minimum d'animaux nécessaires au maintien de ces lignées et aux expérimentations. Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R tout en obtenant des résultats avec des analyses statistiques satisfaisantes. Notre approche holistique permet d'étudier plusieurs facteurs de risque sur le même animal afin de tirer profit de chaque groupe expérimental. Nous améliorons au maximum nos méthodes et procédures opératoires pour limiter la détresse et la souffrance des animaux (surveillance, période d'acclimatation lors d'un changement d'environnement, hébergement en groupe (enrichissement est ajouté dans leurs cages) sauf cas spécifique requis pour une procédure, anesthésie gazeuse pour tout prélèvement, points limites définis en amont des procédures, procédures d'euthanasie appropriées). Ce projet prévu pour 5 ans nécessitera au total 2880 souris. Pour chacune de ces procédures, Ce projet permettra de mieux comprendre les interactions entre le microbiote humain et les organes cibles des différents

facteurs de risque cardiovasculaires afin de pouvoir par la suite, élaborer une thérapie efficace et moins contraignante pour les patients.

L'objectif du projet est d'étudier l'impact du microbiote humain sur la physiologie de l'hôte ce qui est impossible *in vitro*, ni chez l'homme *in vivo*.

13981 Compte tenu de la prévalence et de l'incidence de l'obésité et de son cortège de désordres physiopathologiques associés, il est important de rechercher de nouvelles substances capables de contrôler et de limiter la prise de poids et/ou la survenue des complications associées. Parmi ces substances, le lactose, un sucre issu du lait, présente un index glycémique bas et laisse penser que des préparations à base de ce sucre pourraient présenter des effets d'intérêt vis-à-vis de l'obésité induite par l'alimentation.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'effet sur la glycémie et la sécrétion d'insuline de différentes préparations afin de développer des produits au goût sucré mais présentant un faible index glycémique.

L'étude se divise en trois parties. Tout d'abord, une étude pilote permettra de faire la preuve de concept de la réponse glycémique suite à une absorption de lactose chez l'adulte. Dans cette étude, 7 souris C57Bl6/J mâles seront utilisées afin de déterminer la dose minimale de lactose pouvant induire une réponse glycémique (4 solutions de lactose testées). En fonction des résultats obtenus lors de cette première étude, 8 solutions sucrées différentes dérivées du lactose seront administrées à 15 souris afin de comparer leurs effets sur la glycémie post-prandiale, lors d'une seconde étude. Les molécules les plus intéressantes seront testées à différentes concentrations sur la glycémie post-prandiale (15 animaux) et la sécrétion d'insuline (15 animaux) dans une troisième partie. 4 sets de solutions dérivés du lactose seront étudiés dans cette 3ème partie pour un total de 187 souris (étude pilote - 7 souris ; solutions sucrées dérivées du lactose - 4 x (15 + 30 souris)).

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

-Remplacement: La mesure de la réponse glycémique suite à l'absorption de boissons sucrées met en jeu de nombreux tissus et systèmes physiologiques qu'il n'est à l'heure actuelle pas possible de modéliser *in vitro* et *in silico*. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'être humain.

-Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes et chaque individu sera son propre témoin.

-Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. Les animaux seront hébergés en cage de 3 individus, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft). Une crème anesthésique sera appliquée localement avant incision et prélèvement de sang à la queue ainsi que sur les oreilles avant le perçage pour identification. Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress.

13982 L'hémophilie est une maladie génétique récessive due à un déficit d'un facteur de coagulation induisant une anomalie de coagulation du sang. C'est une maladie génétique héréditaire scindée généralement en 3 groupes, Hémophilie A, B ou C (il existe d'autres types d'hémophilies beaucoup plus rares). Les hémophiles de type A ou B sont liées au chromosome X. Ces types sont donc sexe-dépendant et transmis généralement de mère en fils. L'hémophilie de type C n'est pas liée aux chromosomes sexuels et peut donc affecter indifféremment hommes et femmes. Dans tous les cas la maladie est liée à un défaut dans un gène codant pour un facteur de coagulation (facteur VIII pour le type A, facteur IX pour le type B et facteur XI pour le type C) et se traduit par des temps de saignement plus long et, des hémorragies d'organes. Au niveau musculaire elle se caractérise par la présence d'hématomes, au niveau articulaire par de l'hémarthroses. L'atteinte peut-être plus ou moins grave en fonction de la nature de la mutation et donc les conséquences plus ou moins sévères.

Dans cette étude nous nous focaliserons sur un type particulier d'hémophilie, celui lié au défaut de synthèse du facteur IX (hémophilie type B) pour lequel il existe plusieurs centaines de mutations différentes. Fort de notre expérience en thérapie génique, nous allons tester deux approches pour proposer, au final, deux traitements possibles pour cette maladie en permettant une réexpression du facteur IX sain.

Une approche de "gene editing" c'est à dire de correction de la maladie par suppression du gène défectueux et apport du gène thérapeutique.

Une approche innovante de "virus enveloppés" où nous protégerons des virus modifiés (virus non virulent, porteur du gène thérapeutique) des défenses de l'organisme (système immunitaire) tout en profitant des formidables capacités des virus à intégrer les différentes cellules de l'organisme pour apporter le gène thérapeutique.

Approche de thérapie par "gene editing" (60 animaux nécessaires)

Cette technologie récente permet une approche particulièrement intéressante pour les maladies génétiques. C'est une technologie qui permet de venir supprimer le gène muté et apporter un gène sain pour le remplacer. Pour cette approche le traitement, consistant en une seule injection intraveineuse, sera testé sur des animaux sains et malades. Nous comparerons également les différences entre injection précoce et injection tardive en injectant 2 jours après la naissance ou à l'âge adulte, 2 mois après la naissance.

Approche de thérapie par "virus enveloppés" (135 animaux nécessaires)

Les virus utilisés renferment le gène d'une protéine de la coagulation humaine (le facteur IX). Cependant ces virus étant des corps étrangers pour l'organisme le système immunitaire pourrait s'attaquer à eux, diminuant l'efficacité du traitement. Dans le but d'améliorer cette thérapie, nous souhaitons protéger ces virus des défenses immunitaires grâce à une enveloppe membranaire, un exosome, non immunogène.

Une fois cette nouvelle technique développée, nous commencerons par la tester *in vitro* pour éviter l'utilisation inutile d'animaux si les résultats escomptés ne sont pas suffisants. Nous injecterons alors les différents virus (seul ou avec exosome et injection de solution saline comme contrôle négatif) dans des souris non malades pour vérifier le niveau de réponse du système immunitaire chez ces animaux (66 animaux non transgéniques). Et si les résultats sont concluants, nous injecterons ces mêmes virus à des animaux malades (hémophiles) pour tester l'efficacité du traitement (69 animaux transgéniques).

Pour ces expériences, en fonction des groupes (liés aux doses de traitements testées) des animaux âgés de 6 semaines au début du protocole seront injectés 1 ou 2 fois par voie intraveineuse. Une partie des animaux sera analysée après un seul traitement par virus enveloppé 3 semaines après le premier traitement, la deuxième partie à 6 semaines après le début du traitement et une deuxième injection à 3 semaines pour tester la réponse immunitaire liée à des injections répétées.

Dans tous les cas, pour les deux approches thérapeutiques, lors du sacrifice des animaux, des prélèvements de sang et de tissus seront effectués pour tester l'efficacité des traitements.

Durant toute l'expérimentation les animaux seront surveillés quotidiennement. Un contrôle plus poussé sera effectué chaque semaine (pesée, manipulation individuelle de chaque animal).

Dans l'ensemble pour ce projet 210 animaux seront nécessaires (195 pour les injections et contrôle, 15 pour la reproduction).

Dans l'ensemble pour ce projet plusieurs réflexions ont permis de limiter au maximum l'utilisation du nombre d'animaux et des procédures expérimentales sur chacun d'eux.

- Une partie de la recherche sera effectuée en amont *in vitro*. Leurs résultats permettront d'étudier directement les meilleures stratégies sans toutes les tester *in vivo*.

- Les couples reproducteurs seront limités et optimisés afin de générer le maximum d'animaux d'intérêts dans le temps le plus court possible.

- Les groupes d'animaux contrôles (dont la variabilité au niveau des analyses est plus faible que chez les animaux traités) seront composés d'un nombre réduit d'animaux (n=3 en contrôle des groupes de 5 et n=5 en contrôle des groupes de 10).
- Les dates de prélèvements ont été adaptés pour n'utiliser pour plusieurs expériences qu'un seul et même groupe d'animaux contrôle.
- Les contrôles "techniques" des procédures expérimentales ne seront testés que sur une partie des animaux contrôles

Lors de la construction de ce projet tout a été mis en oeuvre pour remplacer l'utilisation des animaux et réduire les procédures appliquées à chacun d'en eux dans le souci de respect animal.

13983 La neurostimulation et plus particulièrement la stimulation cérébrale est une méthode appliquée pour répondre à des questions fondamentales dans le domaine des neurosciences et amène souvent au développement de nouveaux outils thérapeutiques, que ce soit pour traiter les maladies neurodégénératives ou pour cartographier les parties éloquentes du cerveau pour assister le chirurgien dans l'excision d'une tumeur cérébrale. Actuellement, il est possible d'assurer cette stimulation avec un signal électrique via l'utilisation d'électrodes implantables ou encore avec l'utilisation de l'optogénétique, reposant sur l'utilisation d'altérations génétiques des neurones cibles pour les rendre sensibles à une radiation optique. Dans le premier cas, il est à noter un manque de sélectivité spatiale de la stimulation, avec notamment une diffusion du signal électrique, quand dans le deuxième cas, le fait de devoir avoir recours à une modification génétique reste limitant pour aller vers une application clinique.

L'objet du projet est de développer les connaissances fondamentales d'un nouveau type de stimulation reposant sur l'exposition du tissu nerveux à une radiation infrarouge, sans utilisation de chromophores exogènes, et d'aller vers le développement de nouveaux outils thérapeutiques. Ce projet reposera sur 2 approches : Approche 1. Etudier l'interaction entre la radiation infrarouge et le tissu cérébral à l'aide d'imagerie calcique. Approche 2. Compléter cette étude et développer une nouvelle génération de dispositifs implantables basée sur la technologie des microélectrodes organiques.

Pour cela, nous prévoyons d'utiliser 255 souris (*mus musculus*) modifiées génétiquement afin d'exprimer une sonde calcique au sein des neurones. Dans un premier temps, une étude sera faite avec trois différentes durées d'impulsion infrarouge, afin de déterminer le seuil d'intensité nécessaire à une stimulation des signaux calciques neuronaux, qui relatent également une activité cérébrale accrue. Par la suite, une étude mécanistique plus approfondie sera effectuée pour une durée d'impulsion précise (celle ayant donné le plus satisfaction au terme de la première phase). Pour cela, les signaux calciques neuronaux, mais également glias (au moyen de marqueurs calciques spécifiques) seront investigués. Enfin, un enregistrement des signaux électriques effectué par le biais de l'utilisation de microélectrodes flexibles organiques sera combiné à l'imagerie calcique afin d'obtenir une signature électrochimique complète du cerveau soumis à une exposition infrarouge.

- Règle des 3R -

REEMPLACER

Ce projet vise à développer les connaissances fondamentales d'un nouveau type de stimulation reposant sur l'exposition du tissu cérébral à une radiation infrarouge. Cela nécessite d'avoir accès à l'activité des "vrais" réseaux neuronaux (c'est à dire, chez des organismes vivants) avec une grande résolution spatio-temporelle. Pour l'instant, cela est impossible *in-silico*, *in-vitro*, et même *in-vivo* avec des méthodes entièrement non-invasives. Nous utiliserons donc, *in-vivo*, une panoplie d'outils d'enregistrement nous permettant d'avoir accès à l'activité de population à l'échelle microscopique: la microscopie multi-photons, et l'utilisation de microélectrodes organiques flexibles.

REDUIRE

Nos questions scientifiques portant sur des sujets encore largement inexplorés, l'amplitude et surtout la variabilité des effets recherchés ne sont connus que partiellement ou pas de tout, ce qui

rend difficile d'évaluer précisément le nombre d'animaux nécessaires pour assurer la fiabilité statistique de notre étude. Nous avons donc estimé ce nombre en utilisant un algorithme d'estimation générale (« resource equation method ») qui nous a amené à des nombres typiques dans la littérature (chaque résultat est à reproduire, de façon incontestable, sur au moins onze individus).

Le nombre d'animaux utilisés sera réévalué en fonction des expériences initiales et dès qu'une quantité suffisante de données aura été collectée. Pour cela, une appréciation rétrospective après la première phase des expériences sera effectuée afin d'adapter ce nombre et de faire un bilan sur la sévérité des procédures. Cette appréciation pourrait être réalisée un an après obtention de l'autorisation, en coordination avec les porteurs de projet et la SBEA.

RAFFINER

Les animaux seront hébergés dans cages enrichies (coton, rouleaux de carton), avec accès illimité à la nourriture et à l'eau. Ils seront vérifiés quotidiennement par des personnes compétentes, en utilisant les critères et notations d'une échelle standardisée d'interprétation des expressions faciales de l'animal, la « mouse grimace scale », intégrés avec des critères comportementaux standard, pour la détection de souffrance et sa comparaison avec les points limites. Protocoles, prémédication, anesthésie (Isoflurane 1.5 à 3% dans Oxygène 100 %), analgésie (Vetergesic, Buprénorphine 0.05 mg/kg), suivi et soins post-opératoires seront mis en place et périodiquement discutés avec un vétérinaire ou un ingénieur d'étude en expérimentation animale, afin de les améliorer et de les mettre à jour.

13984 Les plaquettes jouent un rôle clef dans l'arrêt du saignement. Elles sont également impliquées dans la thrombose artérielle. Suite à la rupture d'une plaque athéromateuse dans une artère malade, les plaquettes adhèrent au site de lésion, s'activent et agrègent. Elles forment un thrombus mural qui peut bloquer l'écoulement du sang et entraîner des pathologies ischémiques graves comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Comprendre les mécanismes qui régulent l'adhésion et l'activation des plaquettes permet d'identifier de nouvelles cibles anti-thrombotiques.

Les plaquettes expriment plusieurs récepteurs à leur surface. Ces récepteurs sont en majorité de la famille des intégrines. Ils jouent un rôle aussi bien dans l'adhérence que dans l'activation des plaquettes sanguines. Le rôle des principales intégrines a bien été décrit dans la littérature mais peu d'études ont abordés le rôle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. L'objectif de ce projet vise à caractériser le rôle de ce récepteur dans les fonctions d'adhérence et d'activation des plaquettes. Ceci permettra de déterminer si l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ pourrait constituer une potentielle cible anti-thrombotique.

Limitation du nombre d'animaux :

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les fonctions des plaquettes. Dans le cadre de cette étude il est impossible de substituer la souris à d'autres modèles, car il n'existe pas d'inhibiteur de ce récepteur qui pourrait être utilisé sur des plaquettes humaines.

Réduction

Une première partie de l'étude sera réalisée en utilisant un modèle de thrombose *ex vivo*, disponible au laboratoire. Il s'agit d'un système de perfusion composé de chambres microfluidiques de très petite taille couplé un système de microscopie. L'utilisation de ce système permet de diminuer le volume de sang utilisé, diminuant par la même occasion, le nombre d'animaux. Toutefois, ce système s'avère incomplet, ne pouvant reproduire totalement les conditions hémodynamiques présentes dans les vaisseaux. Ainsi, des expériences complémentaires nécessitant des données *in vivo* seront nécessaires pour compléter et vérifier les résultats obtenus. Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement

L'utilisation de modèles d'animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

Pour assurer leur confort, les animaux sont hébergés dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux.

Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 1124 souris.

13985 Le cancer colorectal représente un problème majeur de santé publique et touche près de 45 000 personnes en France. C'est la deuxième cause de décès par cancer et est responsable de près de 18 000 décès par an. Bien que la chirurgie constitue le traitement de base du cancer colorectal, la chimiothérapie et les thérapies ciblées sont souvent nécessaires après la chirurgie dans le but de réduire le risque de récurrence. Toutefois, ces traitements se montrent parfois inefficaces et il apparaît donc essentiel de mieux analyser les différents événements moléculaires et cellulaires intervenant tout au long du processus tumoral intestinal afin d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques. L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de la reprogrammation métabolique dans le contrôle de la tumorigenèse intestinale. Nous faisons l'hypothèse qu'en agissant sur le métabolisme énergétique et en limitant la reprogrammation métabolique des cellules tumorales, la prolifération tumorale pourrait être ralentie ou bien stoppée. Dans le cadre de cette étude, nous nous attacherons à : 1) définir l'impact d'une modulation du métabolisme énergétique cellulaire sur l'initiation et la progression du cancer en ciblant directement la cellule tumorale et les cellules de son micro-environnement (cellules immunitaires qui sont connues pour influencer le développement tumoral) ; 2) déterminer le potentiel thérapeutique d'agents pharmacologiques dans le contexte du cancer colorectal. Seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement du cancer colorectal, est envisageable en raison de la complexité des relations entre les différents types cellulaires existant au sein d'une tumeur et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement *in vitro*. Nos travaux reposent sur la caractérisation de modèles murins génétiquement modifiés. Le nombre de souris utilisées sera de 1404 sur 5 ans. Nous analyserons l'impact d'une part de la délétion génique et d'autre part de l'activation pharmacologique d'un régulateur clé du métabolisme énergétique cellulaire sur la tumorigenèse colique dans 2 modèles de cancer colorectal chez la souris. Un modèle de carcinogenèse chimique pour étudier son rôle dans l'initiation du processus tumoral, et un modèle génétique inductible par le tamoxifène afin d'étudier son rôle dans la progression tumorale. Nos procédures expérimentales correspondent à l'induction d'un cancer colorectal par injection d'un produit tumorigène ou par suppression génétique de l'expression d'un suppresseur de tumeur, ensuite au traitement par voie orale avec différentes molécules pharmacologiques pour évaluer leur potentiel thérapeutique sur le développement tumoral. Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance hebdomadaire sera effectuée et intensifiée à deux fois par semaine pendant les phases potentiellement délétères, en respectant des points limites définis permettant d'anticiper la mort de l'animal en cas de souffrance. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de limiter le nombre d'animaux nécessaires tout en s'assurant de la reproductibilité et d'une analyse statistique efficace des résultats. L'élevage des souris sera en adéquation avec le nombre minimal requis. Pour réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, nous utiliserons des techniques non invasives comme l'imagerie par échographie et la coloscopie qui permettent un suivi longitudinal du développement de la tumorigenèse colique. Cette approche méthodologique nous permet de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, ce qui évite la souffrance engendrée par un développement tumoral important. Une veille scientifique continue sera effectuée

évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. A terme, les résultats de ce projet permettront le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter le cancer colorectal.

13986 Notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années à la physiopathologie de la maladie de Parkinson à travers l'étude des formes familiales. Ce projet vise à caractériser les conséquences de l'absence de la protéine Parkine, impliquée dans les formes autosomiques récessives de la maladie, à travers une étude intégrée de leur rôle dans les processus physiopathologiques affectant les neurones et les cellules gliales. L'objectif du projet est en particulier d'éclairer le rôle récemment proposé de ces protéines dans les voies de l'immunité innée et plus particulièrement l'impact de leur absence sur la neuroinflammation. Une étude de 2008 a mis en évidence l'impact délétère sur la survie des neurones dopaminergiques d'injection chronique intrapéritonéale de LPS (Lipopolysaccharide) –une endotoxine bactérienne- dans le contexte d'une déficience en Park2 (le gène codant pour la protéine Parkine). Nous réaliserons cette étude sur des souris knock-out pour Park2 ; un remplacement par un autre modèle n'est pas possible à ce stade. Le projet se déroule en 2 phases : (i) une phase de validation du modèle d'injection (avec utilisation de 3 doses différentes de LPS) et impliquant l'utilisation de 64 animaux ; (ii) une phase d'évaluation des conséquences de l'exposition au LPS (une seule dose) sur des temps post-injection plus longs nécessitant 160 animaux. Les procédures utilisées sont choisies pour limiter toute souffrance. La mise en place du raffinement sera effectuée par l'utilisation d'une analgésie adaptée ou par l'arrêt de la procédure en cas de souffrance ou de mauvaise santé persistantes de l'animal. Enfin, en s'appuyant sur l'étude de 2008 et le calcul de puissance, nous avons limité le nombre d'animaux afin d'inclure uniquement ceux nécessaires à l'obtention d'effets statistiquement significatifs (n=8 par groupe).

Outre à élargir notre compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la mort neuronale dans la maladie de Parkinson, ce projet pourra ouvrir des perspectives thérapeutiques visant à inhiber certaines voies inflammatoires anormalement activées, que nous espérons identifier à travers cette étude.

13987 Contexte : Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 30. 000 plaquettes par μ L de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important et une transfusion peut être envisagée. Une complication post transfusionnelle connue est la production d'anticorps anti-plaquettes par le receveur dirigés contre les plaquettes du donneur, on parle alors d'allo-immunisation. Ainsi, si le receveur développe de tels anticorps de nouvelles transfusions seront inefficaces sur un plan thérapeutique puisque les plaquettes du donneur seront détruites par ces anticorps : on dit alors que le patient est en état réfractaire. Cette problématique est particulièrement importante chez des patients dont les pathologies nécessitent des transfusions plaquettaires récurrentes.

Objectif : Définir les mécanismes qui conduisent à la production d'anticorps anti-plaquettes permettrait d'agir en amont de la transfusion et d'éviter la production de tels anticorps. Des études préliminaires au laboratoire ont permis de suggérer l'implication de certaines sous population de cellules de la rate. Ce projet nous permettra de confirmer ou non le rôle de ces cellules *in vivo* dans la production d'anticorps anti-plaquettes suite à une transfusion et également dans le procédé d'élimination qui a lieu lors d'un état réfractaire. In fine, cibler une population cellulaire spécifiquement avant la transfusion de plaquettes permettrait d'empêcher ces complications post-transfusionnelles.

Méthodologie : La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle animal d'allo-immunisation afin de pouvoir prélever, après la transfusion, différents échantillons (organes, sang) et analyser la prise en charge des plaquettes transfusées et les mécanismes immuns qui en découlent. Ce modèle repose sur la différence entre des molécules qu'on peut retrouver entre le donneur et le receveur. Ce modèle nous permettra de modéliser le phénomène d'alloimmunisation. Nous étudierons notamment avec précision quel sous type de cellules du

receveur prendra en charge les plaquettes transfusées et quelle est la cinétique nécessaire pour cette prise en charge. Une fois les souris alloimmunisées, notre but sera d'identifier les cellules responsables de l'élimination des plaquettes.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des observations suffisamment représentatives. Des expériences préliminaires au laboratoire nous ont permis de fixer à 5 le nombre de souris par conditions testées, ce chiffre tient compte de la variabilité de la réponse immune inter individus. Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Remplacer : Le développement d'une réponse immune met en jeu des mécanismes cellulaires complexes qui se mettent en place sur des durées de plusieurs semaines que seules les expériences avec des animaux permettent de suivre.

Raffiner : La mise au point réalisée en amont pour vérifier que les cellules ciblées sont bien déplétées permettra de n'utiliser que le minimum de souris dans les groupes de souris immunisées.

Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux

- Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture

- Anesthésie de l'animal afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés.

- Injection d'analgésique le cas échéant.

- Mise en place d'une fiche de suivi pour suivre l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. Ils veilleront au bien-être des animaux grâce à l'utilisation d'une grille de scoring et à la définition de points limites permettant d'éviter toutes douleurs ou souffrances inutiles de l'animal.

Ce projet nécessitera 342 souris au maximum

13988 Le sélénium est un oligoélément essentiel dont le déficit induit l'altération de fonctions physiologiques. Il intervient en effet en améliorant l'activité d'enzymes antioxydantes comme la glutathion peroxydase. Au niveau musculaire, une déficience en sélénium peut se traduire par une faiblesse et des douleurs accrues ainsi qu'un contexte inflammatoire important, comme dans la dystrophie myotonique nutritionnelle. Cette déficience est également impliquée dans la maladie de Keshan, une cardiomyopathie retrouvée dans les régions asiatiques en raison de la pauvreté des sols en sélénium. De plus, il a été démontré qu'une carence en sélénium engendre des complications fonctionnelles musculaires. La spiruline, cyanobactérie riche en protéines, phycocyanine, fer, vitamines et oméga-6 possède également des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Elle peut, en outre, être un vecteur de sélénium. La spiruline sélénée est couramment utilisée en tant que complément alimentaire sous forme liquide. Nous souhaiterions donc tester les effets d'une supplémentation en sélénite de sodium (40µg/kg de poids corporel), spiruline (1000 mg/kg de poids corporel) et spiruline enrichie en sélénium (1000 mg/kg de poids corporel, à 350 µg de sélénium par gramme de spiruline pour obtenir, à la fin, des concentrations en sélénium équivalente à celle du sélénite de sodium soit 40 µg/kg de poids corporel) sur les altérations fonctionnelles musculaires engendrées par une carence en sélénium chez le rat.

Ce projet a une durée de 12 semaines. Il impliquera l'utilisation de 40 rats Wistar. Les rats seront répartis en 5 groupes de 8. Un groupe servira de contrôle : les animaux ne seront ni carencés ni

supplémentés. Les animaux des 4 autres groupes seront carencés en sélénium pendant 8 semaines. Ils seront ensuite répartis en 4 groupes : 1 non supplémenté et 3 supplémentés (Sélénite de Sodium, Spiruline et Spiruline séléniée). La supplémentation sera réalisée pendant 4 semaines. A la fin de la supplémentation, les animaux seront mis à mort et les organes et les tissus seront prélevés.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R :

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible.
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente, et en accord avec le principe de réduction.
- Le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie/Analgésie.

13989 Le projet vise à comparer de nouveaux biomatériaux injectables dans le disque intervertébral et leur devenir dans l'organisme. Ces biomatériaux destinés à la médecine humaine ont pour but de maintenir l'espace intervertébral et/ou traiter les patients souffrant de hernie discale. Les études animales seront réalisées chez la brebis. Un maximum de trente-six animaux sera utilisé durant la période des 5 ans du projet. Ces biomatériaux ont fait l'objet d'une étude *in vitro* en culture cellulaire. Néanmoins, le passage chez l'animal est nécessaire afin de vérifier les interactions avec l'organisme et le devenir dans l'organisme. Les études nécessiteront 6 animaux par procédures. Une procédure par an est prévue. Outre l'analgésie per et postopératoire, l'acte chirurgical mini-invasif percutané permet de réduire la douleur. En dehors de la 1ère semaine postopératoire, les brebis sont stabulées dans des bergeries en lot afin de diminuer le stress lié à l'isolement. Les paramètres quantitatifs évalués le sont par des méthodes statistiques non-paramétriques sur séries appariées afin de pouvoir travailler sur des petits effectifs et ainsi réduire le nombre de vies animales utilisées.

13990 Le projet vise à mieux connaître les interactions entre le métabolisme des lipides et la production de glucose au niveau du foie. En effet cet organe joue un rôle fondamental chez l'Homme comme chez les mammifères en général dans le maintien de l'équilibre du sucre dans le sang (glycémie). Le foie a la capacité de stocker le glucose après les repas, sous forme de glycogène, puis de le "libérer" entre deux repas pour maintenir l'équilibre glycémique, de plus lorsque le jeûne se prolonge le foie produit également du glucose "de novo", c'est à dire à partir de substrats non glucidiques. Tout dysfonctionnement hépatique peut conduire à une mauvaise gestion du flux de glucose. Ainsi, un excès de lipides qui s'accumule au niveau du foie va conduire à une perte de la sensibilité à l'insuline et à une production accrue de glucose qui peut mener à un diabète de type 2 (élévation chronique du sucre dans le sang, par perte de la sensibilité à l'insuline associée à un défaut de sécrétion d'insuline).

Nous testerons chez la souris nourrie avec une alimentation normale ou riche en lipides le rôle de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme hépatique des lipides : la sérine palmitoyl transférase 2, ou SPT2, qui fabrique des céramides, une classe de lipides impliqués dans la résistance à l'insuline ; et deux transporteurs de la carnitine, composé endogène qui permet l'entrée des acides gras dans la mitochondrie où ils sont oxydés. Notre hypothèse est que ces protéines pourraient être des cibles thérapeutiques pour les personnes ayant des risques de développer un diabète, ou déjà diabétiques. Afin de démontrer leur action, nous interviendrons sur le foie par des injections de virus capables de provoquer soit une perte de fonction (moindre expression de la protéine cible), soit un gain de fonction avec une surexpression de la protéine.

Le nombre total de souris nécessaires pour ce projet est de 110, nombre minimal pour obtenir des résultats statistiquement fiables et interprétables dans le domaine de la diabétologie, et ce dans une optique de réduction des animaux expérimentaux. Par ailleurs, il n'existe pas actuellement de modèle *in vitro* permettant de tester le rôle de ces protéines sur le métabolisme et en particulier sur le paramètre de la glycémie, qui est la résultante de plusieurs processus physiologiques, le

Remplacement de ces expériences *in vivo* n'est donc pas possible. Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé, dans le respect de la règle des 3R : notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins pré-, per- et postopératoires adéquats, à recourir à l'anesthésie et à l'analgésie, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

13991 La transplantation rénale est le premier choix de traitement de l'insuffisance rénale au stade terminal. La lésion d'ischémie-reperfusion (IR) est une séquence qui comprend le prélèvement de l'organe (phase d'ischémie avec arrêt du flux sanguin), sa conservation et son implantation chez le receveur (phase de reperfusion avec récupération de l'apport sanguin). Ces différentes étapes ont un rôle majeur dans le dysfonctionnement du greffon et la perte de celui-ci. L'objectif de ce projet est de réaliser une lésion d'ischémie-reperfusion sur le rein d'une souris puis de prélever ce rein (après sacrifice de l'animal) pour étudier sa structure et évaluer les dégâts causés par la lésion. La structure des reins sera analysée en IRM fonctionnelle et en histologie. Ces résultats permettront de mieux comprendre ce qu'il se passe et de développer des moyens pour mieux préserver la viabilité de l'organe lors d'une greffe. Les souris subiront une chirurgie au niveau de leur rein droit uniquement. Le rein opéré sera prélevé le lendemain ou 7 jours après l'opération.

Les lieux d'hébergement et d'expérimentation sont différents. Le transfert des animaux d'un lieu à l'autre se fera dans une cage de transport dédiée munie d'un couvercle filtrant. Le trajet dure quelques minutes.

Il n'y a pas de méthodes alternatives pour reproduire ce genre de lésion sur un organe. Les résultats obtenus nous permettront d'améliorer la qualité du greffon dans le cadre des transplantations rénales ce qui améliorerait considérablement la qualité de vie des personnes ayant besoin d'une greffe de rein. Nous utiliserons 23 souris pour ce projet, réparties en 3 groupes : 1 groupe de 3 souris non opérées (leurs reins serviront de référence) et 2 groupes de 10 souris opérées dont l'expérimentation s'arrêtera le lendemain (10 souris) ou 7 jours après la chirurgie (10 souris). Le nombre de souris nécessaire au projet a été déterminé afin d'être statistiquement représentatif (test t student).

Les souris sont hébergées en groupes sociaux avec un enrichissement du milieu (maison en carton, coton) fourni par l'animalerie. Dans le cadre de l'acte chirurgical, une analgésie est mise en place et les souris sont placées sur un tapis thermostaté pendant la chirurgie afin de maintenir une bonne température corporelle. Le suivi post-opératoire sera réalisé quotidiennement par l'expérimentateur. En cas de souffrance, les souris recevront un analgésique. Si la souffrance persiste malgré le traitement, l'expérimentation sera arrêtée.

13992 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie très fréquente et invalidante qui représente un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations conduisant à la destruction des os et du cartilage, pouvant aboutir à des déformations irréversibles des articulations. Malgré les importants progrès thérapeutiques accomplis ces dernières années dans la prise en charge de la PR, notamment avec les biothérapies, environ un tiers des patients restent réfractaires à ces différentes biothérapies. Cette situation impose donc d'étudier de nouvelles pistes thérapeutiques.

La PR est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale au sein de l'articulation. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, processus appelé néoangiogénèse, contribue de façon majeure à cette inflammation par l'apport de composants pro-inflammatoires. Par analogie aux approches visant la néoangiogénèse tumorale, il pourrait être intéressant et novateur de cibler la néoangiogénèse synoviale de la PR.

Notre objectif est de valider le rôle fonctionnel de cibles angiogéniques et inflammatoires *in vivo* dans un modèle murin d'arthrite expérimentale. Cette étude nécessitera l'utilisation de 150 souris.

Nous évaluerons le développement de l'arthrite et de la néoangiogénèse synoviale à l'aide de paramètres cliniques, d'imagerie et d'histologie.

Un suivi très précis avec une évaluation de la douleur est mis en place pour éviter toute souffrance inutile des animaux, des points-limites ont été établis avec une grille d'évaluation de la douleur qui a été développée spécifiquement pour ce type d'étude. Un score de douleur trop élevé implique l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude.

Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Des outils d'imagerie seront utilisés pour utiliser le maximum d'informations de manière non invasive et permettre de limiter encore plus le nombre d'animaux futurs.

Les procédures d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux lors des manipulations.

La finalité de cette étude est le développement futur de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques ou anti-inflammatoires dans la PR pour remplacer ou être associées aux traitements actuellement disponibles.

13993 Un défibrillateur cardiaque sert à arrêter les arythmies cardiaques létales en envoyant un choc électrique. En 2012, 6986 défibrillateurs ont été implantés en France. Jusqu'alors, les sondes des défibrillateurs cardiaques étaient situées dans le cœur (défibrillateur endocavitaire).

Depuis près de 5 ans, le défibrillateur cardiaque entièrement sous cutané est commercialisé en France. La sonde est positionnée sous la peau devant le sternum. Environ 850 implantations ont eu lieu en France en 2016. Le défibrillateur sous cutané permet de ne pas mettre de sonde dans le cœur et donc de diminuer le nombre d'infections cardiaques.

Lors de l'implantation du défibrillateur entièrement sous cutané, le bon fonctionnement de cet appareil est testé.

-Un trouble du rythme cardiaque léthal est provoqué (fibrillation ventriculaire)

-Le défibrillateur reconnaît ce trouble du rythme cardiaque

-Le défibrillateur délivre un choc électrique de 80 joules.

Le choc de 80 joules est délivré quel que soit le poids du patient. Cette énergie est très importante et peut avoir des répercussions sur le cœur, le cerveau et les poumons. Nous ne connaissons pas l'énergie optimale à délivrer en fonction du poids. Défibriller avec la même charge quel que soit le poids est-il réellement pertinent ?

La toxicité cardiaque a déjà été étudiée. Les chocs électriques du défibrillateur avec sonde sous cutanée seraient moins toxiques sur le plan cardiaque que les défibrillateurs endocavitaires.

L'objectif principal de cette étude est de :

Tester le seuil (énergie minimale efficace) de défibrillation sous-cutanée en fonction du poids dans un modèle porcin.

Les objectifs secondaires sont de :

Comparer les seuils de défibrillation sous-cutanés avec les seuils de défibrillation endocavitaires.

Comparer la toxicité cardiaque des deux modes de défibrillation.

Chaque animal (10 porcs Large White, *Sus scrofa domesticus*) est son propre témoin. Il bénéficie de l'implantation d'un défibrillateur endocavitaire et d'un défibrillateur entièrement sous-cutané. Les animaux seront implantés sous anesthésie générale. Le défibrillateur endocavitaire et sous-cutané seront testés à 3 jours d'intervalle à 55 kg, puis 85 kg puis 115 kg et leur efficacité vérifiée comme cela est fait en clinique humaine.

L'ensemble de la procédure d'implantation dure environ 60 minutes et 30 minutes pour la procédure de test.

Outre la surveillance clinique, de nombreuses données seront récupérées dans les mémoires du défibrillateur, l'appareil étant doté d'une fonction de surveillance à distance. La surveillance portera également sur des données biologiques.

Les animaux seront nés et hébergés en élevage jusqu'à un poids de 40kg. Ils sont alors transférés dans notre bâtiment et surveillés quotidiennement pendant 90 Jours dans des box individuels. Si

une pathologie est détectée après leur arrivée (absence de prise alimentaire, prostration, manque de défécation, de diurèse) ils ne seront pas inclus dans l'expérimentation.

Ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacer : ce type d'étude ne peut se faire que sur animal vivant et ne peut être remplacé par un modèle cellulaire ou procédure *ex vivo*. Le choix du modèle porcin est justifié par la similitude de son anatomie et de son influx électrique cardiaque avec ceux de l'homme.

Réduire : nous avons réduit le nombre d'animaux à 10 porcs au total pour cette étude (nombre minimal permettant une analyse statistique des résultats).

Raffiner : le raffinement a été pris en compte puisque sur l'ensemble de la durée du projet, les animaux sont hébergés 90 jours en box individuel adapté à l'espèce (d'une surface de 3m² et d'1m de hauteur, caillebotis au sol), aux parois permettant de sentir et voir leurs congénères dans une salle commune de 18 box. Le cycle nyctéméral est respecté, température constante à 23+/-2°C. La ration journalière respecte les apports journaliers recommandés pour l'espèce. Les signes de mal être seront recherchés. Les traitements anesthésiques et analgésiques ont été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire la souffrance des animaux lors de l'implantation des dispositifs et au cours du suivi. Un cahier de suivi est complété quotidiennement afin de colliger les médications administrées, l'ensemble des procédures et le comportement de l'animal.

13994 Les maladies comme la sclérose en plaque ou le syndrome de Guillain-Barré sont des pathologies du système nerveux résultant de l'attaque des nerfs par ses propres anticorps (maladie auto-immune).

Ces maladies touchent plusieurs millions de personnes à travers le monde. Elles se manifestent par l'apparition de faiblesses musculaires progressives pouvant évoluer vers des troubles musculaires importants. Ces maladies sont chroniques, avec des phénomènes de « poussées » (phases de rémission suivie de phases de rechute) pouvant entraîner des lésions irréversibles.

Les traitements actuels de ce type de pathologies sont basés sur une réduction des réactions inflammatoires des nerfs attaqués par le système immunitaire. Ces stratégies thérapeutiques n'ont pas de but curatif mais ont pour objectif d'atténuer les symptômes. Tous les patients ne répondent pas aux traitements disponibles actuellement et des effets secondaires importants peuvent être rencontrés avec les traitements anti-inflammatoires chroniques. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires et doivent être évaluées sur des modèles expérimentaux avant de pouvoir être mises en application chez l'Homme.

Le principe des modèles animaux permettant de reproduire une maladie auto-immune type sclérose en plaque consiste à injecter chez un animal (souvent le rat), un cocktail d'éléments présents dans la composition des nerfs. Ces protocoles consistent à faire produire des anticorps contre certaines protéines présentes dans les nerfs afin de déclencher des réactions inflammatoires. Ce modèle permet de reproduire les principaux signes cliniques de ces maladies dont notamment les phénomènes de poussées suivis des phases de rémission. Les nouveaux candidats médicaments peuvent alors être évalués sur la base de l'évolution des troubles chez l'animal et par une approche histologique de l'état des nerfs.

Ce projet a pour but de produire et d'évaluer un modèle de maladie auto-immune nécessaire à l'évaluation d'un nouveau candidat médicament. Ce projet impliquera un maximum de 12 animaux, ce qui correspond à un effectif minimum permettant de réaliser une évaluation des différents symptômes à évaluer dans ce type de modèle.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au foussement).
- l'induction du modèle est réalisée sous anesthésie
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés.

- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.

Ce projet est classé avec un degré de sévérité sévère lié aux troubles musculaires pouvant déboucher sur des phénomènes de paralysie.

Les points limites pour ce projet sont :

- Amaigrissement marqué (>30% par rapport au jour de l'induction)
- Perte d'appétit ou incapacité à se nourrir et s'abreuver par la mise en place d'un suivi quotidien de la prise alimentaire
- Douleurs observées par des cris et/ou agressivité de l'animal lors de la manipulation
- Apparition de lésions cutanées consécutive à une paralysie prolongée ou à de l'automutilation

Ce type de modèle est requis par les autorités réglementaires comme preuve de concept de nouvelles approches thérapeutiques en préalable aux essais cliniques chez l'Homme. Le présent projet a pour objectif d'évaluer le modèle sur un nombre limité d'animaux. Le nombre d'animaux maximum prévu pour ce projet est de 12 rats.

13995 La pré-éclampsie est une complication grave de la grossesse qui affecte 2 à 7 % des grossesses et est responsable chaque année de plus de 70 000 décès maternels dans le monde. En France la pré-éclampsie représente également une des principales causes de décès maternels. C'est aussi une des causes majeures de prématurité extrême, étant à l'origine de 20% des naissances prématurées.

Le placenta est la cause principale de la pré-éclampsie. Un défaut de maturation de l'utérus au premier trimestre aboutit à une immaturité du placenta induisant progressivement la libération dans le sang de facteurs toxiques qui vont impacter les vaisseaux sanguins et les reins.

Etre capable de filtrer ces substances toxiques représente une des cibles les plus prometteuses pour le développement de nouveaux traitements de la prééclampsie.

Notre objectif est donc de développer un système de filtration spécifique afin de diminuer les taux de ces substances toxiques afin de rétablir une fonction normale des vaisseaux et des reins.

Une première preuve du concept a été réalisée *in vitro* sur culture placentaire ainsi que sur des échantillons de plasma de femmes pré-éclamptiques. En effet, une réduction significative des substances toxiques a été démontrée après passage dans le système de filtration. La prochaine étape serait donc de confirmer ces résultats sur modèle animal. Au vu du débit d'analyse de notre système, le modèle murin nous semble le plus adapté. Nous avons développé un modèle de souris exprimant ce facteur toxique. Ainsi, nous souhaitons travailler sur ce modèle afin de prouver la compatibilité et l'efficacité *in vivo* de notre système en comparaison aux preuves déjà réalisées *in vitro*.

En premier lieu, nous prouverons *in vitro* la compatibilité de notre système avec des échantillons murins, plasma et sang total. L'expression de la substance toxique sera induite chez des souris sensibles par l'implantation d'une mini-pompe sous-cutanée délivrant une molécule les rendant hypertendues. Puis les souris seront sacrifiées afin de récupérer leur sang qui sera passé sur les colonnes ou des analyses permettront de déterminer non seulement si la substance toxique est bien éliminée mais aussi si la qualité du sang est altérée après le passage sur la colonne. Une fois la biocompatibilité du système établie, nous validerons la réinjection du sang à des souris après passage sur la colonne. D'abord sur des souris contrôles puis à des souris malades exprimant cette molécule toxique afin d'étudier la variation de plusieurs paramètres : pression artérielle, protéinurie, mortalité, histologie rénale.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au plus bas possible, avec réduction au maximum de la souffrance et de l'angoisse des souris. Toute l'optimisation de notre système a été réalisée en amont afin de limiter le nombre d'animaux nécessaires. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 2 ans. Le nombre de souris sera de maximum 50.

Le développement de traitement de la pré-éclampsie est actuellement un des principaux enjeux en médecine périnatale. Ainsi la validation de notre système *in vivo* permettrait de faire un bond dans le développement de notre projet qui pourrait à terme permettre la prolongation de grossesses compliquées d'une pré-éclampsie sévère et ainsi réduire les conséquences d'une prématurité extrême.

13996 Durée du projet : 5ans

Mots clés : modèles de cancer, sensibilité au traitement, nouveaux traitements

Type de recherche : recherche appliquée

Buts du projet : Un nombre croissant d'observations réalisées chez les patients suggèrent que le système immunitaire joue un rôle important dans certains types de traitements du cancer, notamment les immunothérapies. Ce projet vise à étudier l'impact d'une ablation de la rate (splénectomie) sur les nouvelles molécules pouvant avoir une activité anticancéreuse grâce au système immunitaire. La rate est un organe lymphoïde secondaire dont l'effet sur la croissance tumorale est complexe et mal connu. L'étude de l'effet de la splénectomie sur la croissance tumorale sera réalisée chez la souris immunocompétente, au système immunitaire intact, ou chez la souris immunodéprimée, au système immunitaire génétiquement défaillant. Ces études permettront de préciser le rôle de la rate ainsi que de certaines cellules du système immunitaire qui dépendent de la rate, dans l'effet anti ou pro tumoral. Ce rôle peut être particulièrement important dans le cas de traitements par des anticorps thérapeutiques.

Retombées attendues : Cette étude permettra de caractériser de façon extrêmement précise l'implication de la rate sur les anticorps thérapeutiques anticancéreux.

Type d'espèces et nombres d'animaux : cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes et immunodéprimées avec un effectif total prévu de 444 souris

Prise en compte des 3 R : a) remplacement : cette étude cherche à étudier l'effet d'une splénectomie sur la tumeur et doit donc être réalisée sur un organisme entier nécessitant ainsi l'utilisation du modèle animal ; b) réduction : la mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable statistiquement ; c) raffinement : Afin de respecter le bien-être animal, les souris sont dans des cages avec un milieu enrichi avec du coton pour qu'elles se fassent un nid (quotidien de l'animalerie). Avant la mise en place du protocole les souris seront acclimatées aux expérimentateurs du projet afin de limiter leur stress. Les animaux seront observés au minimum 3 fois par semaine durant la durée de l'expérience afin de pouvoir réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse et ainsi améliorer leur bien-être. ; toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans ce cadre, un antalgique ou analgésique sera également utilisé dans les procédures de chirurgie afin d'enrayer la douleur chez l'animal.

13997 La vitamine D (calcipotriol) est couramment utilisée en clinique pour traiter les réactions inflammatoires cutanées de type psoriasis ou acné. Néanmoins, chez un pourcentage important (jusqu'à 20% avec le calcipotriol) de patients traités à l'aide de ce composé, l'effet anti-inflammatoire thérapeutique escompté n'est pas atteint, et au contraire, ces patients peuvent développer des réactions inflammatoires cutanées importantes, qui sont aujourd'hui très mal caractérisées. Les causes et les mécanismes sont notamment inconnus. Dans certains cas, les patients traités avec le calcipotriol pourraient se sensibiliser à ce dérivé de vitamine D et développer un eczéma de contact contre ce composé (c'est à dire devenir allergique).

La cause des eczémas est complexe et reste mal comprise à ce jour. Ces dernières années, une population de lymphocytes mémoires résidant dans les tissus a été mise en évidence. Ces lymphocytes ne recirculent pas dans l'organisme et patrouillent dans les épithéliums à l'interface entre l'organisme et l'environnement. Ils sont notamment impliqués dans la récurrence et la sévérité de l'eczéma.

Il s'agit donc à travers ce projet de mieux caractériser ces réponses inflammatoires et d'étudier si des lymphocytes T mémoires résidant dans la peau (TRM) sont générés lors de sensibilisation au calcipotriol et de mieux caractériser leur rôle. Dans une seconde étape, il s'agira d'évaluer dans quelle mesure la sensibilisation vis-à-vis du calcipotriol a un impact direct sur les propriétés anti-inflammatoires de ce composé dans un modèle murin de psoriasis.

Les expériences ont été conçues en accord avec la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 363 souris, âgées de 8 à 10 semaines au début des protocoles. Aucun test *in vitro* (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier, d'une maisonnette et de tubes en plastique). Dans le cadre de ce projet, les animaux seront anesthésiés pour chaque geste entraînant ou pouvant entraîner un stress ou une douleur pour l'animal. Des points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur de l'animal ont été mis en place. Les soins et les procédures seront réalisés par du personnel qualifié

13998 1-Objectif scientifique du projet

Le Transforming Growth Factor β (TGF β) est une protéine qui joue un rôle dans de multiples processus du développement embryonnaire au stade adulte : la formation des cartilages et os, la régulation du système immunitaire, la régulation du système nerveux, la formation des vaisseaux, ou encore la formation des cellules sanguines. Il agit également au cours de situations pathologiques comme la cicatrisation, la fibrose ou encore la carcinogenèse.

Dans le cadre des cancers, le TGF β joue aussi un rôle très important. Il va empêcher, freiner le développement de la tumeur dans les stades précoces. Mais dans les phases tardives, à cause de mutations, il va plutôt promouvoir son développement. Dans certains cancers comme celui du pancréas, on retrouve d'importantes quantités de TGF β autour de la tumeur. Le TGF β va agir comme médiateur entre les différentes populations cellulaires au cours du développement de la tumeur. Il va inhiber l'activité des cellules immunitaires de l'hôte dirigées contre la tumeur. Il va activer des populations de cellules appelées fibroblastes et qui vont agir comme des protecteurs de la tumeur. Il va aussi activer la production et sécrétion de fibres tout autour de la tumeur afin de former un environnement plutôt protecteur. Le TGF β a donc des effets très variables sur les différentes populations composant la tumeur.

Les bases moléculaires et cellulaires de ce double rôle dans la tumorigenèse sont encore mal comprises. Il est donc crucial d'élucider son rôle sur les différents compartiments cellulaires qui composent une tumeur, ainsi que leur interaction fonctionnelle. Afin d'étudier ces processus nous avons créé un modèle permettant de faire exprimer du TGF β par les fibroblastes. Croisé à un modèle développant des lésions précurseurs de tumeurs, ce modèle permettra à terme de comprendre le rôle du TGF β dans le développement des tumeurs : Ralenti-t-il la formation de lésions de bas grades ? Accélère-t-il la formation de lésion de hauts grades ? Les cellules immunitaires recrutées au niveau de la tumeur sont-elles différentes ou plus nombreuses ? Les fibroblastes sont-ils plus activés ? Y-a-t-il plus de fibres de collagènes déposées ?

Mais l'une des premières étapes est de s'assurer que le modèle créé marche bien, que le TGF β produit est fonctionnel. Pour cela nous allons surexprimer du TGF β dans toutes les cellules de l'organisme de la souris. Si le TGF β est bien fonctionnel cela aura des répercussions qui peuvent s'avérer létales sur le développement de l'animal puisque le TGF β est très impliqué dans la régulation de son développement.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

La validation du modèle surexprimant du TGF β dans les fibroblastes par la génération de souris surexprimant du TGF β dans toutes les cellules permettra à toute la communauté scientifique

d'utiliser un modèle efficace d'étude du rôle du TGFbeta dans différents processus et notamment la croissance des tumeurs. La caractérisation de nouveaux mécanismes pro ou anti tumoraux ainsi que le développement de nouveaux modèles mimant au mieux ce qui est observé en clinique est essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer et représente donc un réel enjeu clinique pour les années à venir.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Seul un organisme entier peut nous permettre d'étudier *in vivo* des interactions complexes entre différents compartiments biologiques à savoir l'effet du TGFβ sur le développement des lésions précancéreuses. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Etant donné la susceptibilité qu'auront les animaux à présenter un phénotype dommageable dès l'état embryonnaire, les animaux inclus dans l'étude bénéficieront d'une surveillance attentive (e. g. comportement, toilettage, poids, apparition de grosseurs) et fréquente pour repérer l'émergence de points limites (e. g. défauts de développement embryonnaire, foetal ou adulte) qui conduiraient à l'arrêt des procédures et à la mise à mort immédiate des souris.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, 75 souris seront utilisées.

13999 L'insuffisance cardiaque « IC » est un syndrome qui se caractérise par l'incapacité du cœur à fournir le débit sanguin nécessaire au bon fonctionnement des organes. Il s'agit d'une maladie grave qui nécessite une prise en charge rapide.

A l'heure actuelle deux formes majeures d'insuffisance cardiaque sont reconnues par la Société Européenne de Cardiologie et l'Association Américaine de Cardiologie:

- L'IC chronique à fraction d'éjection réduite (HF_rEF) : caractérisée par une altération de la capacité du cœur à se contracter. Ce type d'IC survient, dans la plupart des cas, suite à un infarctus du myocarde. 50% des patients insuffisants cardiaques souffrent d'une HF_rEF. A l'heure actuelle, ce type d'IC est bien pris en charge et plusieurs médicaments ont déjà prouvé leur efficacité chez les patients au niveau mondial.

- L'IC chronique à fraction d'éjection préservée (HF_pEF) : caractérisée par une altération du remplissage et de relaxation en présence d'une fonction contractile normale du muscle cardiaque. Parmi les patients souffrant d'IC, la proportion de ceux atteints d'une HF_pEF dans le monde ne cesse d'augmenter (environ 50% des patients insuffisants cardiaques). A l'heure actuelle, aucun traitement n'a montré une efficacité chez le patient HF_pEF. Les patients souffrant de ce type de pathologies constituent une population très hétérogène, où les facteurs de risques (en particulier l'hypertension) jouent un rôle très important dans la progression et l'aggravation de la pathologie.

L'absence ou la mauvaise prise en charge médicale des patients insuffisants cardiaques (HF_pEF ou HF_rEF) peut mener à une insuffisance cardiaque aiguë décompensée, une situation d'altération importante de la fonction cardiaque. Cet état de détresse et d'urgence conduit à l'hospitalisation du patient. Il est donc indispensable de mieux comprendre cette maladie et de développer des médicaments efficaces pour sa prise en charge.

Un modèle animal de l'IC chronique HF_pEF pourrait être le rat SHR/L-NAME. Le rat SHR (Spontaneous Hypertensive Rat) présente une hypertension spontanée et l'administration d'un complément dans l'eau de boisson (L-NAME) engendre des dysfonctions cardio-vasculaires comparables à celles observées chez l'Homme. Ce modèle a été validé au préalable par échocardiographie essentiellement et par histologie du cœur et des vaisseaux.

Les taux sanguins de catécholamines (et autres marqueurs potentiels) pourraient être un bon moyen de suivre l'évolution de la pathologie chez ce modèle. Le but de ce projet est de valider ces biomarqueurs pour le suivi de cette pathologie dans le modèle SHR/L-NAME. Ces biomarqueurs pourraient ensuite permettre de tester l'efficacité de nouveaux médicaments prometteurs sélectionnés au préalable sur des modèles *in silico* ou *in vitro*.

Les taux de catécholamines étant très variables en fonction des manipulations, le moyen le plus adapté de suivre efficacement ces taux est de réaliser les prélèvements de sang de manière automatique, sans contention manuelle, via un cathéter implanté, au préalable, sous anesthésie et selon les règles de l'art. Le suivi des catécholamines sera alors effectué par des dosages sanguins qui pourront être répétés permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaire.

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 2 semaines à 8 semaines. Elles incluent des observations cliniques, des prélèvements sanguins pour dosage de biomarqueurs et éventuellement des traitements (par voie orale ou parentérale), et des mesures du taux de médicament dans le sang. Les prélèvements sanguins sont adaptés en termes de volume et de fréquence conformément à la réglementation et réalisés avec les méthodes les moins contraignantes possibles (par exemple prélèvement sans contention de l'animal via un cathéter implanté ou prélèvement par microsampling).

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

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 500 rats sur une durée de 5 ans. Le nombre de rongeurs utilisé est calculé en fonction de la variabilité des paramètres examinés et confirmé par une analyse statistique.

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

Ce projet permettra de valider des biomarqueurs pour un modèle d'IC chez le rat et permettra par la suite de développer des candidats médicaments pour une pathologie humaine grave et répandue.

14000 La Directive Cadre Européenne sur l'eau fixe le bon état écologique des cours d'eau et la libre circulation des espèces piscicoles. Les propriétaires d'ouvrages transversaux doivent ainsi se mettre en conformité en équipant ou effaçant leur(s) ouvrage(s). Certains maîtres d'ouvrage sont ensuite tenus d'évaluer l'efficacité de ces actions en mettant en place des suivis des comportements des poissons aux abords des ouvrages, avant et/ou après restauration. L'outil RFID est de plus en plus couramment utilisé pour quantifier ces comportements. En effet, il permet de mesurer la proportion d'individus qui cherchent à migrer vers l'amont et ceux qui parviennent effectivement à franchir l'obstacle. Il faut pour cela procéder au marquage d'individus à l'aide de micro-puces RFID appelées PIT tags et équiper les ouvrages à l'aide d'antennes de détection reliées à un lecteur-enregistreur. Pour le cas des ouvrages effacés, l'approche peut également être réalisée en utilisant des antennes et lecteurs mobiles avec prospections de linéaires de cours d'eau à pied.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'effacement d'un seuil transversal infranchissable sur une rivière salmonicole de montagne. Les travaux ont déjà été réalisés. L'étude cible principalement la truite de rivière, mais également une petite espèce accompagnatrice (le chabot) et deux espèces de cyprinidés abondantes dans le cours d'eau (le barbeau et le chevaine). Elle vise à mettre en lumière la restauration de la libre circulation des poissons à la suite des travaux réalisés deux ans plus tôt.

Les poissons seront capturés par pêches électriques, méthode couramment employée pour les inventaires des peuplements de poissons en rivières : 1'000 individus de taille supérieure à 60 mm seront marqués à l'aide de PIT tags de 12 et 23 mm selon leur taille : 670 truites, 150 chabots, 90 chevaines et 90 barbeaux. Leurs déplacements dans la rivière seront suivis uniquement à l'aide d'antennes de détection fixes préalablement installées en aval et en amont de l'ouvrage restauré.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement *in natura*. L'effectif d'individus marqués, est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires des quatre espèces tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). En effet, seule une fraction

minoritaire des individus va migrer, l'autre fraction est résidente et ne cherchera pas nécessairement à remonter la rivière. Les marques PIT tags seront implantées chirurgicalement dans la cavité péritonéale des poissons. Les animaux seront anesthésiés avant les opérations de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel à proximité du lieu de capture (règle des 3R : Raffinement).

14001 Les maladies du système nerveux central (SNC) sont devenues au 21^{ème} siècle la première cause mondiale de handicap, avec souvent des besoins médicaux qui restent très insatisfaits. Ces manques médicaux et thérapeutiques laissent de très nombreuses pathologies, lésions, accidents vasculaires cérébraux sans aucun traitement curatif, voire même palliatif. Ainsi, avec le vieillissement de la population, des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer deviennent des préoccupations majeures et donc un réel enjeu de santé publique. Les recherches actuelles ont augmenté leurs efforts ces dernières années, suscitant de grands espoirs pour les patients malades et leurs familles. Cette demande de projet s'inscrit dans cette dynamique avec pour objectif d'apporter des solutions pour améliorer les perspectives thérapeutiques. De récents travaux scientifiques se sont focalisés sur la compréhension des mécanismes d'apparition et de détections de ces maladies ou cancers, améliorant la précocité des diagnostics et les chances de succès face à la maladie. Il existe des barrières physiologiques du corps humain qui limitent considérablement les possibilités de traitements et constituent de réels challenges thérapeutiques. Le cerveau présente ce type de réseau vasculaire au niveau du SNC, il assure les échanges constants entre le compartiment sanguin et le parenchyme nerveux. Ces échanges sont finement régulés et très sélectifs, d'où le nom de barrière hémato-encéphalique (BHE). Son rôle est d'assurer l'apport d'éléments essentiels au bon fonctionnement du cerveau (glucose, lipides, acides gras, vitamines, protéines), mais aussi sa protection. Cette barrière bloque à la fois, les agressions pathogènes et toxiques provoquées par les bactéries, virus ou micro-organismes, ainsi que le passage de molécules non-spécifiques tels que certains médicaments. La connaissance des mécanismes et acteurs de cette barrière est devenue un réel challenge pour la communauté scientifique, d'autant que de nombreux traitements sont abandonnés par manque de passage efficace. La stratégie sera de faciliter ce passage de biomolécules. Par le développement de molécule-vecteurs, on améliore la biodisponibilité et le passage d'agents thérapeutiques vers le cerveau. Grâce à la reconnaissance spécifique d'un partenaire ou d'un récepteur, le complexe vecteur-médicament pourra franchir cette barrière et agir dans le parenchyme (SNC). D'autres voies de passage et stratégies ont également été envisagées. Le Liquide céphalorachidien (LCR) est un fluide stérile qui entoure, protège et irrigue l'ensemble du SNC. Cette voie, peu étudiée jusqu'alors, n'est pas soumise à la sélection « récepteur dépendant » pour valider directement nos vecteur-médicaments. De plus, utiliser le LCR comme nouvelle alternative à la BHE pourrait améliorer le potentiel d'adressage au cerveau, permettre une médication optimisée par rapport à l'intraveineux (doses revues à la baisse) et d'envisager des traitements moins lourds pour les patients. Dans ce cadre technologique, notre société et son partenaire académique se sont regroupés au sein d'un Laboratoire Commun de Recherche pour le développement de vecteur-médicaments. Ces molécules sont destinées aux traitements de pathologies centrales comme la maladie d'Alzheimer. Certains de ces conjugués sont développés dans le cadre de partenariats académiques ou industriels. Pour mener à bien notre modèle préclinique, nous envisageons après validation *in vitro* de réaliser des expériences sur le petit animal de laboratoire, ici la souris. Ce projet comportera deux procédures pour une durée de 5 ans : Procédure 1: Valider les conjugués vecteur-médicaments au niveau central, *in situ* (parenchyme central) ou par la voie méningée (LCR). Nos Vecteur-médicaments, préalablement sélectionnés et produits, sont testés de manière à valider leurs effets pharmacologiques au niveau central chez le rongeur. Pour cette partie, nous envisageons d'utiliser un nombre maximum de 1800 souris sur 5 ans, calculé sur la base de : un total de 36 animaux par conjugué, 6 groupes de 6 individus, (groupes tests ou effet dose, contrôle négatif). Ce n de 6 correspond au nombre nécessaire pour encadrer et valider l'effet pharmacologique d'un conjugué (cf. 3. 3. 5 « Approche statistique utilisée »), en tenant aussi compte de la variabilité physiologique entre individus. A raison d'une dizaine de conjugués par an, l'estimation arrive à 360 souris/an et 1800 souris/5ans. Procédure 2: Utiliser l'approche LCR comme nouvelle stratégie d'adressage au niveau central, de

traitement ou de suivi (dosage marqueurs ; imagerie) des pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Annexe II) Pour cette partie, nous utiliserons un nombre maximal de 1200 souris (modèle pathologique Alzheimer et contrôle sain dit « Wild Type ») sur 5 ans, calculé sur la base de : un total de 24 souris par conjugué, réparties en 4 groupes de 6 individus (1 groupe test et contrôle par lignée, Alzheimer et WT), ce nombre doit permettre de valider un effet significatif du vecteur-médicament sur ce modèle pathologique correspondant. Au total, nous utiliserons au maximum 240 animaux/an et donc 1200 souris/5ans. Pour cette demande d'une durée de 5 ans, nous envisageons donc d'utiliser au maximum : 1800 animaux (procédure 1), 1200 (procédure 2), soit un total de 3000 souris. Au cours de ces 2 procédures, le responsable de projet s'assurera du bien-être animal et notamment de sa conformité avec la règle des « 3 R » (ANNEXE I). Toutes les procédures pouvant générer de l'inconfort et/ou de la douleur aux animaux, sont soumises à un protocole anesthésique et analgésique rigoureux qui comporte une anesthésie générale volatile (Isoflurane) ou fixe (Kétamine-Xylazine) associée à une anesthésie locale (lidocaïne) des analgésiques (paracétamol et buprénorphine). Ajouté à cela un hébergement optimal (T°C, cycle lumière 12h/12h..), du suivi global et bien être (nombre d'individus par cage, absence de stress et mutilations, soins ou euthanasie si besoin), avec un enrichissement (litières, boîtes cartons, tunnels) et change qui seront assurés par les animaliers.

14002 La stéatose hépatique non alcoolique est une maladie du foie progressive complexe qui débute par l'accumulation de graisses dans le foie sans consommation excessive d'alcool. Elle est fortement associée au syndrome métabolique (obésité + résistance à l'insuline + dyslipidémie). En France, on estime à plus de 10 millions les personnes atteintes de stéatose, associée dans 90 % des cas à un syndrome métabolique, à l'obésité ou ses complications. Parmi elles, 80% des 6 à 7 millions d'obèses et 90% des 3 à 4 millions de diabétiques. Il n'existe actuellement aucun traitement médicamenteux approuvé montrant une efficacité pour la stéatose hépatique non-alcoolique. Seules les mesures hygiéno-diététiques constituent un traitement qui permet un ralentissement de la maladie pour qu'elle n'évolue pas en cirrhose.

Dans ce projet, nous chercherons à mettre en évidence l'effet d'ingrédients (de composition confidentielle) sur le développement de la stéatose hépatique dans le but de développer un complément alimentaire ralentissant le développement de la maladie.

Ce complément alimentaire pourra s'adresser à des patients chez qui une stéatose hépatique non alcoolique a été diagnostiquée en complément des mesures hygiéno-diététiques, aux personnes présentant une sensibilité génétique au développement une stéatose hépatique en dépit d'une bonne hygiène de vie, ainsi qu'aux patients obèses à titre préventif.

Nous étudierons l'effet biologique des compléments alimentaires en utilisant un modèle d'obésité induite par l'alimentation (régime apportant 60% de l'énergie sous forme de lipides supplémenté ou non par le complément à tester) chez des souris C57Bl6/J mâles. La durée du régime sera de 16 semaines. 50 animaux, soit 5 groupes de 10 animaux, seront nécessaires pour cette étude.

Le développement de l'obésité et ses conséquences métaboliques seront caractérisés par:

- pesée hebdomadaire et une mesure de la prise alimentaire à 1, 8 et 15 semaines
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique à 0, 8 et 16 semaines
- prélèvement de fèces à 1, 8 et 15 semaines pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime.

La survenue de pathologies hépatiques sera observé à l'issue des 16 semaines de régime grâce à:

- pesée et histologie du foie
- dosage de marqueurs circulants de l'inflammation, du stress oxydatif
- quantification des activités enzymatiques hépatiques
- mesure de l'expression génique de marqueurs du métabolisme des acides gras
- prélèvement et analyse du contenu caecal

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* et *in silico* pour étudier l'impact de compléments alimentaires la prévention de l'obésité et l'apparition de la stéatose hépatique non-alcoolique. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'Homme.

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

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. Les animaux seront hébergés en cage de 3 à 4 individus, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft). Une crème anesthésique sera appliquée localement avant incision et prélèvement de sang à la queue ainsi que sur les oreilles lors du perçage pour identification. Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress. Les animaux seront pesés et observés quotidiennement par les expérimentateurs afin de contrôler leur bien-être.

14003 L'objectif de ce projet est de générer une quantité d'informations nécessaires et suffisantes pour constituer une base de données relative aux propriétés du plasma du rat. Pour générer cette référence (base de données), le prélèvement et la préparation d'un litre de plasma de rat est nécessaire. Ce litre de plasma assurera pour plusieurs années une source pertinente d'informations et permettra d'utiliser l'approche de lecture croisée lors des soumissions aux agences européennes, ceci afin de limiter les essais expérimentaux sur animaux.

Le prélèvement et la préparation du plasma se fera sur plusieurs lots d'animaux qui seront ensuite combinés pour atteindre la quantité de plasma souhaitée. Le prélèvement et la préparation du plasma seront effectués selon des protocoles validés et autorisés par le comité d'éthique animale. Notamment, le prélèvement de sang sera effectué sous anesthésie volatile après vérification de la profondeur de l'anesthésie par du personnel formé et compétent.

L'intérêt particulier de ce projet réside dans l'utilisation d'animaux de réforme. Les animaux les plus lourds seront utilisés afin de limiter le nombre d'animaux mis en œuvre dans cette procédure.

Dans ce contexte le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet est estimé à 420.

Une démarche qualité rigoureuse et une supervision de chaque lot d'animaux par le directeur d'étude permettront d'appliquer toute alternative respectueuse du bien-être animal.

Ce projet est réalisé dans un objectif de progrès scientifique avec des conséquences positives sur l'Homme ou l'animal. Il permet un gain potentiel en terme d'acquisition de compétences et connaissances diverses. Le nombre important d'animaux nécessitera l'intervention du Directeur d'études et de la Structure de Bien-Être Animal (SBEA) indispensable afin de respecter la règle des 3R.

14004 La malnutrition chronique chez l'enfant est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement, touchant aujourd'hui plus de 150 millions d'enfants dans le monde. Les conséquences à long terme sont particulièrement délétères, notamment marquées par un retard de croissance ainsi que des déficits neurocognitifs qui persistent à l'âge adulte même si ces enfants entrent dans un protocole de renutrition thérapeutique. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie sont les protéines. Une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un retard de croissance chez le rongeur. Des études récentes suggèrent un lien fort entre composition du microbiote intestinal et régime nutritionnel. En particulier, une intervention probiotique chez le rongeur dans un contexte de malnutrition permet de compenser partiellement le retard de croissance chez le juvénile. Un probiotique se définit comme un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels.

L'objectif de cette étude est de mettre en place chez la souris un protocole mimant les protocoles de renutrition chez l'enfant et d'étudier la dynamique de croissance dans ce contexte. Pour cela, les souriceaux seront alimentés avec un aliment appauvri en protéines pendant différents temps puis

réalimentés avec un aliment normal. Nous étudierons ensuite si l'administration d'un probiotique pendant la période de réalimentation avec un aliment normal est susceptible d'améliorer la dynamique de croissance des animaux. Cette étude permettra donc l'établissement d'un modèle préclinique ouvrant la porte à de possibles visés thérapeutiques chez l'Homme. Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R: raffiner, réduire, remplacer. En effet, le nombre d'animaux et de groupes a été réduit au maximum sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions nutrition/microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal. Des points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur de l'animal ont été mis en place. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié.

Cette étude se fera sur 290 souris

14005 Les maladies du système nerveux central (SNC) sont devenues au 21^{ème} siècle la première cause mondiale de handicap, avec souvent des besoins médicaux qui restent très insatisfaits. Ces manques médicaux et thérapeutiques laissent de très nombreuses pathologies, lésions, accidents vasculaires cérébraux sans aucun traitement curatif, voire même palliatif. Ainsi, avec le vieillissement de la population, des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer deviennent des préoccupations majeures et donc un réel enjeu de santé publique. Les recherches actuelles ont augmenté leurs efforts ces dernières années, suscitant de grands espoirs pour les patients malades et leurs familles. Cette demande de projet s'inscrit dans cette dynamique avec pour objectif d'apporter des solutions pour améliorer les perspectives thérapeutiques. De récents travaux scientifiques se sont focalisés sur la compréhension des mécanismes d'apparition et de détectons de ces maladies ou cancers, améliorant la précocité des diagnostics et les chances de succès face à la maladie. Il existe des barrières physiologiques du corps humain qui limitent considérablement les possibilités de traitements et constituent de réels challenges thérapeutiques. Le cerveau présente ce type de réseau vasculaire au niveau du SNC, il assure les échanges constants entre le compartiment sanguin et le parenchyme nerveux. Ces échanges sont finement régulés et très sélectifs, d'où le nom de barrière hémato-encéphalique (BHE). Son rôle est d'assurer l'apport d'éléments essentiels au bon fonctionnement du cerveau (glucose, lipides, acides gras, vitamines, protéines), mais aussi sa protection. Cette barrière bloque à la fois, les agressions pathogènes et toxiques provoquées par les bactéries, virus ou micro-organismes, ainsi que le passage de molécules non-spécifiques tels que certains médicaments. La connaissance des mécanismes et acteurs de cette barrière est devenue un réel challenge pour la communauté scientifique, d'autant que de nombreux traitements sont abandonnés par manque de passage efficace. La stratégie sera de faciliter ce passage de biomolécules. Par le développement de molécule-vecteurs, on améliore la biodisponibilité et le passage d'agents thérapeutiques vers le cerveau. Grâce à la reconnaissance spécifique d'un partenaire ou d'un récepteur, le complexe vecteur-médicament pourra franchir cette barrière et agir dans le parenchyme (SNC). D'autres voies de passage et stratégies ont également été envisagées. Le Liquide céphalorachidien (LCR) est un fluide stérile qui entoure, protège et irrigue l'ensemble du SNC. Cette voie, peu étudiée jusqu'alors, n'est pas soumise à la sélection « récepteur dépendant » pour valider directement nos vecteur-médicaments. De plus, utiliser le LCR comme nouvelle alternative à la BHE pourrait améliorer le potentiel d'adressage au cerveau, permettre une médication optimisée par rapport à l'intraveineux (doses revues à la baisse) et d'envisager des traitements moins lourds pour les patients. Dans ce cadre technologique, notre société et son partenaire académique se sont regroupés au sein d'un Laboratoire Commun de Recherche pour le développement de vecteur-médicaments. Ces molécules sont destinées aux traitements de pathologies centrales comme la maladie d'Alzheimer. Certains de ces conjugués sont développés dans le cadre de partenariats académiques ou industriels. Pour mener à bien notre modèle préclinique, nous envisageons après validation *in vitro* de réaliser des expériences sur le petit animal de laboratoire, ici la souris. Ce projet comportera deux procédures pour une durée de 5 ans : Procédure 1: Valider les conjugués vecteur-médicaments au niveau central, *in situ* (parenchyme central) ou par la voie méningée (LCR). Nos Vecteur-médicaments, préalablement sélectionnés et produits, sont testés de manière à valider leurs effets pharmacologiques au niveau

central chez le rongeur. Pour cette partie, nous envisageons d'utiliser un nombre maximum de 1800 souris sur 5 ans, calculé sur la base de : un total de 36 animaux par conjugué, 6 groupes de 6 individus, (groupes tests ou effet dose, contrôle négatif). Ce n de 6 correspond au nombre nécessaire pour encadrer et valider l'effet pharmacologique d'un conjugué (cf. 3. 3. 5 « Approche statistique utilisée »), en tenant aussi compte de la variabilité physiologique entre individus. A raison d'une dizaine de conjugués par an, l'estimation arrive à 360 souris/an et 1800 souris/5ans. Procédure 2: Utiliser l'approche LCR comme nouvelle stratégie d'adressage au niveau central, de traitement ou de suivi (dosage marqueurs ; imagerie) des pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Annexe II) Pour cette partie, nous utiliserons un nombre maximal de 1200 souris (modèle pathologique Alzheimer et contrôle sain dit « Wild Type ») sur 5 ans, calculé sur la base de : un total de 24 souris par conjugué, réparties en 4 groupes de 6 individus (1 groupe test et contrôle par lignée, Alzheimer et WT), ce nombre doit permettre de valider un effet significatif du vecteur-médicament sur ce modèle pathologique correspondant. Au total, nous utiliserons au maximum 240 animaux/an et donc 1200 souris/5ans. Pour cette demande d'une durée de 5 ans, nous envisageons donc d'utiliser au maximum : 1800 animaux (procédure 1), 1200 (procédure 2), soit un total de 3000 souris. Au cours de ces 2 procédures, le responsable de projet s'assurera du bien être animal et notamment de sa conformité avec la règle des « 3 R » (ANNEXE I). Toutes les procédures pouvant générer de l'inconfort et/ou de la douleur aux animaux, sont soumises à un protocole anesthésique et analgésique rigoureux qui comporte une anesthésie générale volatile (Isoflurane) ou fixe (Kétamine-Xylazine) associée à une anesthésie locale (lidocaïne) des analgésiques (paracétamol et buprénorphine). Ajouté à cela un hébergement optimal (T°C, cycle lumière 12h/12h..), du suivi global et bien être (nombre d'individus par cage, absence de stress et mutilations, soins ou euthanasie si besoin), avec un enrichissement (litières, boîtes cartons, tunnels) et change qui seront assurés par les animaliers.

14006 Avec près de 45% des causes de décès, le cancer apparaît comme la principale cause de mortalité chez les chiens de plus de 10 ans. Les traitements traditionnellement utilisés pour lutter contre le cancer sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Ils restent malheureusement insuffisants pour l'élimination totale et durable d'un certain nombre de tumeurs. Dans ce cadre le développement de nouvelles thérapies apparaît nécessaire.

De nouvelles technologies thérapeutiques émergent dans la prise en charge des cancers, parmi celles-ci, la virothérapie. Son principe repose sur la lyse de la cellule tumorale par un virus au cours de son cycle infectieux. Le développement de Poxvirus fait partie de cette approche de virothérapie oncolytique. Parmi les produits développés, nous testons un virus de la Vaccine rendu capable de convertir, au niveau de son site d'injection, la tumeur, la 5-fluorocytosine (5-FC) en molécule de chimiothérapie efficace: le 5-fluorouracil (5-FU). Les premiers modèles précliniques, reposant sur l'utilisation de xénogreffes de cellules tumorales canines et humaines sur souris nude, ont montré une réduction efficace de la masse tumorale. De plus, l'exposition de lignées cellulaires tumorales et d'explants de tumeurs mammaires canines a permis de constater une lyse des cellules tumorales canines en présence de TG6002. Ces résultats prometteurs ont permis d'initier une étude clinique de phase I/II avec le virus associé à la 5-FC dans la prise en charge de carcinome colique en médecine humaine.

Une étude de tolérance sur 5 chiens Beagles sains a permis de confirmer une bonne tolérance au virus oncolytique administré par voie intramusculaire (mimant la voie intratumorale). En particulier aucune toxicité clinique, hématologique ou biochimique n'a été constatée. Enfin, aucune excrétion du vecteur n'a été observée par voie salivaire, urinaire ou fécale.

Une étude de tolérance visant à évaluer la tolérance à la 5-FC à la posologie de 200 mg/kg/j (dose habituelle en clinique chez le chien) est l'objet du présent projet. Les informations sur la toxicité dans cette espèce sont peu nombreuses. A cette posologie, une toxicité digestive (nausée, vomissement, diarrhée), hématologique (anémie, leucopénie, thrombopénie) et hépatique est possible. De plus des rapports de cas laissent suspecter une possible toxicité cutanée se manifestant par des lésions érosives localisées sur le chanfrein, les babines et le scrotum.

L'objectif de cette étude est de caractériser la pharmacocinétique et la tolérance de la 5-flucytosine administrée par voie orale chez quatre chiens Beagle sains.

Quatre chiens adultes de races Beagle, seront acclimatés pendant 7 jours. A l'issue de cette période de la 5-flucytosine sera administrée par voie orale à la dose de 100mg/kg deux fois par jour pendant 15 jours.

Des examens cliniques quotidiens, biochimiques et hématologiques à J0, J7 et J14 et J21 seront réalisés afin d'évaluer la tolérance à la 5-flucytosine.

Des dosages sériques seront réalisés à J0, J7, J14 et J21 afin de caractériser la pharmacocinétique de la 5-flucytosine.

Le nombre d'animaux est réduit à 4, ce qui est l'absolu minimum afin d'observer des effets indésirables majeurs et fréquents. La détection de phénomènes plus rares ou plus discrets sera un des objectifs de la phase d'essai clinique réalisée sur des animaux naturellement cancéreux, pour lesquels le traitement expérimental peut être considéré comme suffisamment intéressant et sûr dès lors que leur pronostic est mauvais et qu'une toxicité importante est improbable, ce qui est le but de la présente étude. Si le produit provoque des manifestations évoquant une souffrance ou des réactions pathologiques chez l'animal suffisantes pour qu'aucun essai clinique ne soit possible, le traitement sera interrompu et des soins médicaux seront apportés aux animaux, pouvant aller jusqu'à une euthanasie le cas échéant. Enfin, comme la souris ne peut pas remplacer le volontaire sain chez l'homme, la mise en oeuvre de traitements novateurs en médecine vétérinaire ne peut pas se passer d'un essai sur des animaux sains de l'espèce considérée.

14007 Les réseaux neuronaux de l'hippocampe sont cruciaux pour les fonctions cérébrales supérieures telles que les processus d'apprentissage et la mémoire. Ces processus permettant d'encoder, de stocker et d'utiliser une information sont essentiels à l'adaptation de chaque individu à son environnement en perpétuel changement. Le développement normal des réseaux neuronaux hippocampiques est donc vital pour la survie de l'individu et une perturbation de ce processus induit des troubles mnésiques. Etant donné l'impact sociétal des maladies de la mémoire, une meilleure compréhension des mécanismes régissant le développement et la plasticité neuronale représente une priorité croissante pour le traitement de ces pathologies.

Par ailleurs, il est maintenant bien établi qu'au sein du gyrus denté de la formation hippocampique, de nouveaux neurones sont formés et intégrés tout au long de la vie, un phénomène connu sous le nom de neurogénèse adulte. Par différentes approches (transgénèse, pharmacologie e..) nous avons mis en évidence un rôle des néoneurones dans la mémoire spatiale et contextuelle. Le présent projet se propose de mieux comprendre le rôle de ces neurones dans la mémoire déclarative en employant une approche d'optogénétique couplée à un apprentissage dans un labyrinthe radiaire. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de 500 souris.

Afin de respecter le R de réduction, une même souris sera utilisée dans différents tests comportementaux. Dans un souci de Raffinement, les séquences comportementales seront organisées de façon à réduire au maximum l'inconfort des animaux et le personnel, formé, portera une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, de soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée au cours des étapes de l'apprentissage, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. Enfin par définition, ce projet, qui vise à mesurer les capacités mnésiques, ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus et le Remplacement animal n'est pas possible.

14008 La rétine, l'organe neurosensoriel de l'œil, est soumis à différents stress et facteurs environnementaux qui peuvent conduire à son altération et à la cécité. Paradoxalement, la lumière

est un de ces facteurs. Depuis peu, l'apparition de l'éclairage par diodes électroluminescentes (LED) relance le problème de la toxicité rétinienne induite par la lumière quel que soit leur intérêt en termes d'économies de consommation électrique. Ces dispositifs présentent une forte luminance et un spectre d'émission riche en lumière bleue, très énergétique et toxique pour la rétine. Ainsi, chez l'Homme, la lumière bleue comporte un risque de développer une maculopathie (altération de la macula, la zone de vision distincte) à court terme et une DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge) à long terme.

Des règlements sur les caractéristiques de notre lumière artificielle s'imposent pour protéger nos yeux. Des normes existent mais de nombreux aspects de la phototoxicité ne sont pas pris en compte en raison du manque de données scientifiques.

C'est le cas de l'exposition chronique (la législation actuelle considère seulement l'exposition aiguë) ou la stabilité de la lumière (si elle est clignotante ou stable), le moment de la journée où les individus sont exposés, les interactions avec d'autres composés potentiellement toxiques pour la rétine auxquels nous sommes quotidiennement exposés. Parmi les éléments peu toxiques fréquemment rencontrés, nous allons évaluer une éventuelle augmentation de la sensibilité de la rétine à la lumière lorsque les animaux sont exposés à de l'oxyde de titane (TiO₂) ou du benzo-pyrène (BaP), deux polluants fréquents de l'air des zones urbaines ainsi que des aliments. De plus, des expériences récentes suggèrent que les valeurs limites d'exposition en termes d'intensité lumineuse couramment utilisées sont surévaluées.

La toxicité pour la rétine de ces différentes situations va être évaluée dans ce projet pour donner un soutien scientifique à un ajustement de la réglementation si celle-ci s'avérait trop permissive. Les expériences seront réalisées chez le rat. 360 rats seront utilisés et distribués de la façon suivante : 110 seront utilisés pour établir les doses limites non toxiques, 40 pour évaluer l'influence de la modulation temporelle (clignotement de la lumière), 110 pour l'influence sur la phototoxicité du moment de la journée, 60 pour l'exposition combinée à deux toxiques : le BaP et le TiO₂ et 40 pour l'évaluation de l'exposition chronique.

Les éléments investigués ayant besoin de l'interaction entre les différentes cellules rétinienne, le tissu rétinien et les vaisseaux et les nerfs de la choroïde, cette recherche ne peut être faite que sur l'animal. Nous avons réduit le nombre d'animaux en jumelant les expériences pour utiliser les mêmes contrôles à chaque fois que ceci est possible. Nous prévoyons aussi des sets d'évaluations différents pour l'œil droit et le gauche pour maximiser l'utilisation des tissus. Les animaux auront de l'eau et de la nourriture ad libitum et seront libres de leurs mouvements dans les cages. Ils seront surveillés quotidiennement pendant l'exposition lumineuse en recherchant des symptômes oculaires tels que rougissement ou grattage des yeux. Toute altération locale ou du comportement de l'animal entraînera un arrêt de l'expérience.

14009 Le réseau vasculaire du système nerveux central (SNC) permet des échanges constants entre le compartiment sanguin et le parenchyme nerveux. Ce système vasculaire permet des échanges finement régulés et est très sélectif d'où son nom de barrière hémato-encéphalique (BHE). Son rôle est d'assurer l'apport d'éléments essentiels au bon fonctionnement du cerveau (glucose, lipides, acides gras, vitamines, protéines), mais aussi sa protection. Cette barrière bloque à la fois, les agressions pathogènes et toxiques provoquées par les bactéries, virus ou microorganismes, ainsi que le passage de molécules non-spécifiques tels que certains médicaments. A l'heure où les pathologies du SNC sont la première cause mondiale de handicap et constituent avec le vieillissement de la population des enjeux majeurs de santé publique, la connaissance des mécanismes et des acteurs de cette barrière est devenue un réel challenge pour la communauté scientifique. En effet, de nombreux traitements sont développés pour traiter les neuropathies, mais beaucoup d'entre eux sont abandonnés, notamment en raison d'un passage insuffisant à travers la BHE. Plusieurs stratégies sont en cours d'exploration pour faciliter le passage de molécules et surtout de biomolécules à travers la BHE. Parmi ces stratégies, on trouve le développement de molécules-vecteurs qui améliorent la biodisponibilité et le passage d'agents thérapeutiques à travers la BHE. Ainsi, grâce à la reconnaissance spécifique d'un partenaire ou d'un récepteur, le complexe vecteur-médicament pourra franchir cette barrière et agir dans le parenchyme nerveux.

Dans le cadre du développement de telles technologies, notre société et son partenaire académique se sont regroupés au sein d'un Laboratoire Commun de Recherche (LCR), avec le soutien de laboratoires académiques pour le développement de peptides vecteurs conjugués à des molécules thérapeutiques (pVectors). Ces molécules sont destinées aux traitements de lésions post-traumatiques ou de pathologies du SNC comme la maladie d'Alzheimer. Certains de ces peptides conjugués à des agents thérapeutiques sont développés dans le cadre de partenariats avec d'autres partenaires académiques ou industriels. Dans la continuité de nos recherches et afin de développer les phases pré-cliniques de nos candidats médicaments, nous envisageons de réaliser des expériences sur le petit animal de laboratoire (rongeurs). C'est pourquoi, nous réalisons une demande d'autorisation à l'expérimentation. Ce projet se déclinera en 3 procédures et pour une durée de 5 ans : Procédure 1 : Développer des pVectors stables, hautement spécifiques de la BHE et sans effets secondaires pour les animaux. Nos pVectors conjugués préalablement criblés, sélectionnés et produits (tests vitro internes et collaborations) sont testés de manière à valider leur stabilité plasmatique et l'absence d'effets secondaires chez le rongeur. Pour cette partie, nous envisageons d'utiliser un nombre maximum de 75 souris par an. Ce nombre est calculé sur la base de : -15 animaux par conjugué, correspondant au nombre minimum et nécessaire pour pouvoir tester un pVector de façon fiable et robuste. -5 conjugués par an, correspondant au nombre maximal de candidats retenus après avoir été développés et produits pour être testés.

Procédure 2 : Evaluer le potentiel de ciblage de nos candidats en biodistribution (pharmacocinétique) et plus particulièrement l'adressage au cerveau. Seuls et uniquement les conjugués validés en procédure 1 (c. à. d. bonne stabilité et sans effets secondaires) seront testés afin de mesurer leur temps de demi-vie *in vivo* et leur répartition dans l'organisme. Dans cette procédure, chacun des conjugués sera testé en parallèle de son contrôle négatif sur deux lignées de souris (une lignée d'intérêt vs son contrôle) et ce, sur des cinétiques incluant 5 temps. Chaque groupe ou lot test sera composé de 4 souris, soit un total de 80 souris par candidat. Au final, à raison de 5 études par an et un nombre de 400 souris, cela représente 2000 animaux sur 5 ans. Procédure 3 : Mesurer l'effet de ces mêmes vecteurs-médicaments sur des modèles pathologiques spontanés. En cas de concentration au niveau de l'organe d'intérêt (validation procédure 2), ici le cerveau, les mêmes tests seront réalisés sur des souris développant la pathologie cible (Alzheimer). De cette manière, pour chaque étude qui atteint la procédure 3, le candidat et son contrôle seront testés à différentes doses de traitement (3 doses), sur des animaux Alzheimer présentant deux stades évolutifs de la maladie (précoces et tardifs) et animaux sains. Au total, nous aurons besoin de 18 lots de 3 animaux (54 souris). Si l'on considère que l'ensemble des études (5/an) sont des succès, nous arrivons à un total maximal de 270 animaux/an pour cette 3ème procédure. Pour cette étude globale (3 procédures) d'une durée de 5 ans, nous envisageons donc d'utiliser au maximum : 375 animaux pour la procédure 1, 2000 pour la procédure 2 et 1350 pour la procédure 3, soit un total de 3725 animaux. Toutes les procédures pouvant générer de l'inconfort et/ou de la douleur aux animaux, sont soumises à un protocole anesthésique et analgésique rigoureux qui comporte une anesthésie générale fixe (Kétamine-Xylazine). Ajouté à cela un hébergement optimal (T°C, cycle lumière 12h/12h..), du suivi global et bien être (nombre d'individus par cage, absence de stress et mutilations, soins ou euthanasie si besoin), avec un enrichissement (litières, boîtes cartons, tunnels) et change qui seront assurés par les animaliers.

14010 La septicémie, principale cause d'admission dans les unités de soins intensifs, est caractérisée par une réponse inflammatoire générale résultant d'une infection non contrôlée. En dépit de la mise en oeuvre des directives internationales, des progrès médicaux constants et des milliards dépensés chaque année, la plupart des mécanismes impliqués dans la progression de cette infection sont encore aujourd'hui mal compris. Cependant, des données récentes ont permis d'émettre l'hypothèse qu'un excès de stimulation adrénergique pouvait expliquer le déséquilibre du système immunitaire à l'origine de la réponse inflammatoire exagérée. Des publications démontrent, à ce propos, un effet bénéfique lors de l'administration d'antagonistes des récepteurs β 1-adrénergiques. Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous souhaitons tester les effets de l'aténolol (β 1-bloquant adrénergique) chez des souris septiques. Pour cela, nous serons amenés à employer deux modèles de sepsis internationalement reconnus, le modèle par péritonite (CLP) et le modèle par

administration de lipopolysaccharide (LPS). Les souris seront réparties en 8 groupes (Contrôle, Contrôle-Aténolol, LPS, LPS-Aténolol, sham, sham-Aténolol, CLP, CLP-Aténolol).

L'utilisation d'animaux, dans cette étude, est dictée par la complexité de cette pathologie touchant plusieurs organes simultanément. L'effet ne peut donc être considéré qu'à l'échelle d'un organisme. De plus, il existe une bonne corrélation entre les données obtenues chez les souris (en cas de synergie des résultats du modèle LPS et du modèle CLP) et l'homme au cours du sepsis (remplacement).

Pour limiter le nombre d'animaux, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire, sur une analyse bibliographique poussée de cette pathologie et une optimisation des prélèvements sanguins et des prélèvements tissulaires (cœur, foie, reins, poumons, surrénales, muscles squelettiques) effectués après euthanasie sur chaque animal. Nous nous sommes également limités à l'utilisation d'un traitement potentiel (couramment employés chez l'homme), qui en cas de résultats positifs permettra d'envisager des études cliniques chez l'homme (réduction).

Une attention particulière sera portée au bien-être animal à travers un suivi régulier des souris et ce afin de déceler tout excès de douleur, ce qui introduirait un biais dans nos recherches. Ce suivi a été planifié selon les critères définis dans le document ci-après et reconnu au niveau international (raffinement).

Au total, nous serons amenés à utiliser 360 souris pour cette étude.

14011 La septicémie, principale cause d'admission dans les unités de soins intensifs, est caractérisée par une réponse inflammatoire généralisée résultant d'une infection non contrôlée.

En dépit de la mise en oeuvre des directives internationales, des progrès médicaux constants et des milliards dépensés chaque année, la plupart des mécanismes impliqués dans la progression de cette infection sont encore aujourd'hui mal compris.

Parmi les patients décédés, nombreux sont ceux ayant développé une insuffisance surrénalienne relative (ISR) au préalable.

Afin d'étudier cette insuffisance en détail, nous souhaitons créer un modèle animal. Pour cela, nous serons amenés à employer du lipopolysaccharide (LPS) administré en aigu ou en chronique.

Les animaux seront répartis en 3 grands groupes: Contrôle, LPS (modèle aigu) et ISR (modèle chronique).

L'utilisation d'animaux, dans cette étude, est dictée par la complexité de cette pathologie touchant plusieurs organes simultanément. L'effet ne peut donc être considéré qu'à l'échelle d'un organisme (remplacement).

Pour limiter le nombre d'animaux, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire, sur une analyse bibliographique poussée de cette pathologie et une optimisation des prélèvements effectués sur chaque animal (réduction).

Une attention particulière sera portée au bien-être animal à travers un suivi régulier des souris et ce afin de déceler tout excès de douleur, ce qui introduirait un biais dans nos recherches. Ce suivi a été planifié selon les critères définis dans le document ci-après et reconnu au niveau international (raffinement).

Au total, nous serons amenés à utiliser 450 souris pour cette étude.

14012 L'obésité et le surpoids touchent actuellement plus de 40% de la population française. L'excès de masse grasse qui caractérise l'obésité augmente le risque de nombreuses maladies. L'intestin, et notamment son microbiote et sa fonction de barrière intestinale sont altérés chez l'individu en surpoids ou obèse. Cette « hyperperméabilité » semble concourir à l'inflammation de bas grade à l'origine de leurs troubles métaboliques. Des travaux récents ont montré dans des contextes d'inflammation intestinale chronique que le maintien de la barrière intestinale était fortement dépendant de la fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales. Nous faisons l'hypothèse qu'un changement de l'environnement luminal (i. e. composition du microbiote et des

métabolites produits) comme observé chez le patient obèse pourrait modifier la fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales, induisant une hyperperméabilité intestinale, une inflammation intestinale puis systémique. L'objectif du projet est ainsi d'évaluer si les dysfonctionnements de la barrière épithéliale intestinale observés dans l'obésité sont liés à un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules épithéliales intestinales et si oui, quelles en sont la cause, en lien notamment avec les modifications de l'environnement luminal.

Trois cent vingt souris seront utilisées dans ce projet. Une première étape consistera à étudier la fonction mitochondriale chez des souris rendues obèses par la consommation d'un régime hyperénergétique pendant 12 semaines versus des souris témoin non obèses (aliment standard) et des souris recevant le même régime (standard ou hyperénergétique) supplémentés en antioxydant. Les perturbations métaboliques de ces animaux seront évaluées par un test de tolérance orale au glucose. Une deuxième étape consistera à évaluer le rôle du microbiote intestinal dans les perturbations observées en déplaçant le microbiote d'une partie des souris en leur administrant un cocktail d'antibiotiques dans l'eau de boisson (colistine, vancomycine, streptomycine et ampicilline). Ce projet comporte 3 procédures : réalisation d'un test de tolérance au glucose, administration d'antibiotiques dans l'eau de boisson et alimentation avec un aliment hyperénergétique supplémenté ou non en antioxydant ou standard supplémenté en antioxydant.

Ce projet respecte la règle des 3R. Remplacement: cette étude de relation entre microbiote, intestin et inflammation systémique ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Elle nécessite donc l'utilisation d'animaux. Réduction: l'utilisation du modèle souris permet de s'appuyer sur les nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Le nombre d'animaux prévu permet d'effectuer des tests statistiques sans nécessité de répétition ultérieure de l'expérience. Raffinement: L'utilisation d'un anesthésique local permettra de réduire la douleur liée au prélèvement de sang. La consommation du régime hyperénergétique devrait entraîner une intolérance au glucose qui n'est pas létale pour les animaux. Les autres procédures prévues sont non invasives et les prélèvements de tissus seront réalisés après la mort. Le poids des souris et de leur comportement constitue les points limites de l'expérimentation (prise ou perte de poids excessive par rapport au poids de départ, apathie de l'animal). Ces paramètres seront évalués de façon bi-hebdomadaire.

14013 En élevage porcin, le sevrage est une étape critique pour le porcelet séparé de sa mère alors qu'il est encore immature sur le plan digestif et immunitaire. En effet, des diarrhées surviennent souvent à ce moment, avec des conséquences néfastes sur la santé et le bien-être des porcelets. Ces diarrhées résultent généralement d'un déséquilibre de la flore intestinale. L'implantation d'une flore favorable pourrait contribuer à prévenir les diarrhées de post sevrage et permettre de poursuivre la réduction de l'utilisation des antibiotiques au moment du sevrage. Des fèces de 600 porcelets ont été analysées pour la composition microbienne et cette composition microbienne associée à la santé des porcelets en post sevrage afin d'identifier des communautés bactériennes favorables à la santé et la robustesse des porcelets. L'expérience présente a pour but d'évaluer, chez un petit nombre de porcelets, si l'implantation de ces communautés bactériennes favorables est possible sans effet négatifs sur la santé et la croissance.

Pour estimer les effets de l'administration par voie orale d'une communauté bactérienne non pathogène et à priori associée à une bonne santé, 4 portées nées de truies n'ayant jamais reçu d'antibiotiques seront sélectionnées. Cela représente entre 48 et 60 porcelets sachant qu'il est difficile de prévoir à priori le nombre de porcelets à la naissance. Dans chaque portée, deux porcelets seront conservés comme témoins (administration de 1 ml d'une solution saline par voie orale). Les porcelets restants (recevront 2 suspensions bactériennes différentes (nous cherchons à avoir au minimum 5 porcelets par portée pour chaque suspension). La solution saline et les suspensions seront administrées tous les 2 jours à partir de 2 jours après la naissance et jusqu'à l'âge de 3 semaines à l'aide d'une seringue délivrant 1 ml dans la gueule. Des prélèvements de fèces seront réalisés à 14j, 21j (juste avant le sevrage) et à 26j (juste après le sevrage). Une prise de sang sera réalisée à 21 et 26j. Les paramètres mesurés sont le microbiote fécal sur les prélèvements de fèces ainsi que la formule sanguine (hématocrite, nombre de globules rouges,

lymphocytes) et des paramètres du statut oxydatif et inflammatoire sur les échantillons de sang. Les porcelets resteront en vie à l'issue de cette expérience.

Cette expérience se veut de petite dimension pour apporter une preuve de concept avant d'être éventuellement appliquée à plus grande échelle. La règle des 3 R sera respectée. Remplacement : un essai d'implantation d'une communauté bactérienne au niveau digestif en prenant en compte l'évaluation de l'absence d'effet néfaste sur la santé ne peut se faire que sur des animaux vivants dans des conditions contrôlées. Réduction : le nombre de porcelets par traitement a été validé par des essais antérieurs. Raffinement: le nombre de prélèvements de fèces et de sang sur chaque porcelet sera limité (3 et 2) afin de réduire les manipulations des porcelets qui resteront avec leur mère jusqu'au sevrage à 3 semaines d'âge. Le faible volume de suspension administrée (1 ml) sera dégluti sans peine. L'ensemble des interventions sera réalisé par du personnel expérimenté.

14014 Le réseau vasculaire du système nerveux central (SNC) permet des échanges constants entre le compartiment sanguin et le parenchyme nerveux. Ce système vasculaire permet des échanges finement régulés et est très sélectif d'où son nom de barrière hémato-encéphalique (BHE). Son rôle est d'assurer l'apport d'éléments essentiels au bon fonctionnement du cerveau (glucose, lipides, acides gras, vitamines, protéines), mais aussi sa protection. Cette barrière bloque à la fois, les agressions pathogènes et toxiques provoquées par les bactéries, virus ou microorganismes, ainsi que le passage de molécules non-spécifiques tels que certains médicaments. A l'heure où les pathologies du SNC sont la première cause mondiale de handicap et constituent avec le vieillissement de la population des enjeux majeurs de santé publique, la connaissance des mécanismes et des acteurs de cette barrière est devenue un réel challenge pour la communauté scientifique. En effet, de nombreux traitements sont développés pour traiter les neuropathies, mais beaucoup d'entre eux sont abandonnés, notamment en raison d'un passage insuffisant à travers la BHE. Plusieurs stratégies sont en cours d'exploration pour faciliter le passage de molécules et surtout de biomolécules à travers la BHE. Parmi ces stratégies, on trouve le développement de molécules-vecteurs qui améliorent la biodisponibilité et le passage d'agents thérapeutiques à travers la BHE. Ainsi, grâce à la reconnaissance spécifique d'un partenaire ou d'un récepteur, le complexe vecteur-médicament pourra franchir cette barrière et agir dans le parenchyme nerveux. Dans le cadre du développement de telles technologies, notre société et son partenaire académique se sont regroupés au sein d'un Laboratoire Commun de Recherche (LCR), avec le soutien de laboratoires académiques pour le développement de peptides vecteurs conjugués à des molécules thérapeutiques (pVectors). Ces molécules sont destinées aux traitements de lésions post-traumatiques ou de pathologies du SNC comme la maladie d'Alzheimer. Certains de ces peptides conjugués à des agents thérapeutiques sont développés dans le cadre de partenariats avec d'autres partenaires académiques ou industriels. Dans la continuité de nos recherches et afin de développer les phases pré-cliniques de nos candidats médicaments, nous envisageons de réaliser des expériences sur le petit animal de laboratoire (rongeurs). C'est pourquoi, nous réalisons une demande d'autorisation à l'expérimentation. Ce projet se déclinera en 3 procédures et pour une durée de 5 ans : Procédure 1 : Développer des pVectors stables, hautement spécifiques de la BHE et sans effets secondaires pour les animaux. Nos pVectors conjugués préalablement criblés, sélectionnés et produits (tests vitro internes et collaborations) sont testés de manière à valider leur stabilité plasmatique et l'absence d'effets secondaires chez le rongeur. Pour cette partie, nous envisageons d'utiliser un nombre maximum de 75 souris par an. Ce nombre est calculé sur la base de : -15 animaux par conjugué, correspondant au nombre minimum et nécessaire pour pouvoir tester un pVector de façon fiable et robuste. -5 conjugués par an, correspondant au nombre maximal de candidats retenus après avoir été développés et produits pour être testés. Procédure 2 : Evaluer le potentiel de ciblage de nos candidats en biodistribution (pharmacocinétique) et plus particulièrement l'adressage au cerveau. Seuls et uniquement les conjugués validés en procédure 1 (c. à. d. bonne stabilité et sans effets secondaires) seront testés afin de mesurer leur temps de demi-vie *in vivo* et leur répartition dans l'organisme. Dans cette procédure, chacun des conjugués sera testé en parallèle de son contrôle négatif sur deux lignées de souris (une lignée d'intérêt vs son contrôle) et ce, sur des cinétiques incluant 5 temps. Chaque groupe ou lot test sera composé de 4 souris, soit un total de 80 souris par candidat. Au final, à raison de 5 études par an et un

nombre de 400 souris, cela représente 2000 animaux sur 5 ans. Procédure 3 : Mesurer l'effet de ces mêmes vecteurs-médicaments sur des modèles pathologiques spontanés. En cas de concentration au niveau de l'organe d'intérêt (validation procédure 2), ici le cerveau, les mêmes tests seront réalisés sur des souris développant la pathologie cible (Alzheimer). De cette manière, pour chaque étude qui atteint la procédure 3, le candidat et son contrôle seront testés à différentes doses de traitement (3 doses), sur des animaux Alzheimer présentant deux stades évolutifs de la maladie (précoces et tardifs) et animaux sains. Au total, nous aurons besoin de 18 lots de 3 animaux (54 souris). Si l'on considère que l'ensemble des études (5/an) sont des succès, nous arrivons à un total maximal de 270 animaux/an pour cette 3ème procédure. Pour cette étude globale (3 procédures) d'une durée de 5 ans, nous envisageons donc d'utiliser au maximum : 375 animaux pour la procédure 1, 2000 pour la procédure 2 et 1350 pour la procédure 3, soit un total de 3725 animaux. Toutes les procédures pouvant générer de l'inconfort et/ou de la douleur aux animaux, sont soumises à un protocole anesthésique et analgésique rigoureux qui comporte une anesthésie générale fixe (Kétamine-Xylazine). Ajouté à cela un hébergement optimal (T°C, cycle lumière 12h/12h..), du suivi global et bien être (nombre d'individus par cage, absence de stress et mutilations, soins ou euthanasie si besoin), avec un enrichissement (litières, boîtes cartons, tunnels) et change qui seront assurés par les animaliers.

14015 L'obtention de biomarqueurs d'acquisition simple, permettant d'identifier des profils métaboliques d'échantillons biologiques est capitale dans les domaines de la nutrition humaine et animale et de la santé. Le développement de marqueurs peu invasifs est donc un enjeu important pour le diagnostic, le suivi chez les patients porteurs de pathologies chroniques en lien avec la nutrition et l'adaptation de la nutrition. Ceci est notamment le cas pour les maladies métaboliques qui favorisent la survenue d'une stéatose hépatique qui expose les patients aux stéatohépatites, à la cirrhose et au cancer du foie.

Notre objectif est d'identifier des marqueurs qui témoignent de l'entrée dans le syndrome métabolique, de l'apparition de la stéatose hépatique et de ses complications. Nous utiliserons un modèle de souris exposé à une alimentation riche en lipides et hydrate de carbone, surchargées ou non en fer, facteur aggravant de la pathologie. Des signatures des modifications des états métaboliques seront recherchées, sur le plasma- marqueur instantané- et les cellules sanguines – utilisées comme marqueur sur une période plus prolongée-. Nous utiliserons des approches d'analyse globale – études spectroscopiques et réalisation de profils métallomiques- qui nous permettront de déterminer des signatures de l'état métabolique qui seront la base de futures études chez l'homme. 100 souris seront incluses dans cette étude.

Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R.

-Remplacer : L'obtention de profil métaboliques nécessite l'utilisation de modèles animaux. La détermination de profils "signatures" permettra dans le futur dans les études ultérieures (tests thérapeutiques, études mécanistiques) de réduire le nombre d'animaux qui pourront être suivis de manière non invasive.

-Réduire : Le nombre de souris en réalisant le protocole chez l'animal entier sur le nombre d'animaux strictement nécessaire pour une analyse pertinente compte tenu des méthodes utilisées.

-Raffiner : Le protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative, les traitements réalisés étant l'utilisation de différents régimes alimentaires, la réalisation d'une injection sous cutanée unique et d'une ponction veineuse.

Les résultats permettront d'avoir une meilleure compréhension des maladies hépatiques dans le but d'améliorer la prise en charge des patients.

14016 Lors du développement de médicaments, il est nécessaire de réaliser des études de toxicologie afin d'évaluer la sécurité du candidat médicament. Une attention particulière est portée sur l'évaluation des effets toxiques au niveau du système nerveux central et plus particulièrement au niveau du cerveau. Ce dernier est entouré par la barrière hémato-encéphalique qui le sépare de la circulation sanguine, le protégeant ainsi des toxines et pathogènes. La mesure du passage du candidat

médicament au travers de la barrière hémato-encéphalique permet évaluer les potentiels effets neurotoxiques mais également l'efficacité du candidat médicament lorsque ce dernier est à visée neurologique. Dans ce cadre, l'objectif de ce projet est de mettre au point la technique de microdialyse intracérébrale chez le miniporc afin de mesurer la quantité de candidat médicament ou ses potentiels métabolites présents dans le cerveau. Le projet comprend une première étude de faisabilité chez deux animaux, suivie d'une seconde étude de validation avec l'utilisation de molécules connues pour traverser ou non la barrière hémato-encéphalique. Enfin, ce modèle sera utilisé pour tester le passage dans le liquide céphalo-rachidien au cours d'études précliniques. Le projet utilisera au maximum 204 miniporcs (études de faisabilité, de validation et précliniques ultérieures incluses). Les animaux seront hébergés individuellement dans un milieu enrichi et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux. Ce projet rentre dans le cadre de la mise en œuvre de la règle des 3R (réduction, remplacement et raffinement). En effet, l'utilisation des miniporcs permettra de réduire et de remplacer le nombre de primates non-humains utilisés actuellement pour ce type d'étude comme modèle animal non-rongeur. De plus, le développement de la microdialyse intracérébrale chez le miniporc permettra d'améliorer la prédictivité des modèles animaux dans le cadre de l'évaluation de la toxicité au niveau du système nerveux central.

14017 Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une maladie génétique neurodéveloppementale rare (1/25000) et complexe, pour laquelle il n'existe aucun traitement qui en cible la cause. Le SPW est causé par l'absence d'expression de sept gènes co-exprimés dans le système nerveux central, incluant le gène NECDIN. À l'avenir, une thérapie génique pour la ré-expression de ces gènes sera certainement la meilleure façon de guérir le SPW. Pourtant, à notre connaissance, il n'y a pas eu jusqu'à présent d'approche de thérapie génique pour le SPW qui ait réussie.

Le phénotype des patients atteints du SPW est complexe et évolue avec l'âge. Cependant, une altération est présente tout au long de la vie des patients et est dramatique, représentant la première cause de mortalité des patients : un dysfonctionnement du contrôle central respiratoire. Cette altération des réseaux de neurones qui contrôlent la respiration induit de profondes apnées, à la fois pendant le sommeil et pendant l'éveil, et une forte diminution de la réponse ventilatoire en hypoxie et en hypercapnie. Parmi les différents modèles murins du SPW, seules les souris invalidées pour le gène Necdin (Ndn-KO) reproduisent les altérations respiratoires présentes chez les patients. Les souris Ndn-KO présentent d'ailleurs une mortalité à hauteur de 30% entre le premier et le troisième jour de vie, due aux altérations respiratoires, comme en atteste la cyanose souvent présente chez les nouveau-nés.

Dans ce projet de recherche, nous souhaitons (i) étudier ces altérations respiratoires pour en comprendre les mécanismes pathologiques, dans la poursuite des travaux réalisés au sein de notre équipe depuis plus de dix ans, et (ii) développer une preuve de concept pour une thérapie génique pour le SPW. En effet, nous avons récemment montré que l'altération d'un groupe de neurones spécifique est certainement la cause des altérations respiratoires chez les souris Ndn-KO. Nous utiliserons des approches transgéniques, par croisement de souris génétiquement modifiée, ou par injections virales, pour moduler l'expression de Necdin. Nous pourrions ainsi induire l'expression de Necdin que dans les neurones d'intérêt, afin de tester les répercussions que cela aura sur l'activité respiratoire des souris. En modulant l'expression de Necdin dès la période embryonnaire, avant que l'invalidation de Necdin ne puisse commencer à générer des altérations, nous pourrions ainsi tester nos hypothèses sur les mécanismes conduisant à ces altérations, et envisager des approches pour y remédier. Si certains outils viraux permettent d'empêcher la survenue des altérations respiratoires lorsqu'ils sont injectés pendant la période embryonnaire, alors une deuxième phase du projet sera réalisée en testant l'injection de ces virus à la naissance. En effet, le SPW est diagnostiqué à la naissance, et toute approche à visée thérapeutique doit être développée avec cette contrainte. Nous espérons ainsi réaliser une preuve de concept pour une thérapie génique pour le SPW.

Les animaux utilisés seront exclusivement des souris, car c'est actuellement le seul modèle animal du SPW (nombre maximum de souris utilisées : 1104). Les études se réalisant durant la période périnatale, les souris seront utilisées sans distinction de genre.

Ce projet cherche à découvrir le mécanisme pathologique conduisant aux altérations respiratoires dans le SPW, et à développer une approche thérapeutique. Il relève donc par essence d'un manque profond de connaissances sur le sujet, et ne peut pas être remplacé par des approches alternatives, *in silico* par exemple.

Ce projet de recherche s'inscrit dans les principes de réduction (1) et de raffinement (2) des règles éthiques sur l'expérimentation animale.

(1) Notre projet de recherche s'effectue en étapes successives, dont les résultats conditionnent au fur et à mesure la poursuite du projet, ce qui nous permettra de n'utiliser qu'un minimum de groupes de souris. Notamment, les études avec injections post-natales ne seront pas réalisées si les injections prénatales ne permettent pas d'empêcher la survenue des altérations respiratoires, et seules les constructions virales les plus pertinentes cliniquement seront utilisées en injection postnatales. Egalement, la variabilité interindividuelle sera réduite par l'utilisation de souches murines fixées génétiquement. Enfin, les outils statistiques les plus appropriés seront utilisés, afin d'utiliser un minimum d'animaux par groupe expérimental pour atteindre des conclusions valides sur l'effet de nos expérimentations.

(2) Les animaux seront hébergés dans une animalerie conventionnelle, dans des cages avec environnement enrichi et au nombre d'animaux par cage limité, avec accès à l'eau et la nourriture ad libitum, dans des pièces thermo-contrôlées et au cycle jour/nuit en 12h/12h. Les animaux seront anesthésiés pour toutes les procédures expérimentales induisant de la douleur. Cette anesthésie sera accompagnée d'une analgésie et d'un suivi post-opératoire appropriés (utilisation d'une fiche de suivi individuelle). Le porteur du projet possède une grande expérience dans ce domaine.

14018 Le cancer du pancréas avec près de 10000 nouveaux cas par an, est l'un des cancers les plus graves, avec une espérance de survie à 5 ans très faible (inférieure à 5%). A l'heure actuelle, la chirurgie reste le meilleur traitement possible pour les 15 à 20 % de patients dont la tumeur est opérable. Et bien que certains protocoles de chimiothérapie aient permis une amélioration de la durée et de la qualité de vie des patients, le traitement de ce cancer reste un enjeu majeur des recherches en oncologie. S'il est maintenant clairement établi que certaines cellules du microenvironnement influencent la tumorigenèse et la progression tumorale, le rôle des cellules nerveuses et notamment des fibres nerveuses infiltrant les tumeurs reste mal compris. Les premiers résultats ont montré que le système nerveux périphérique est important pour la progression des cancers de type adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC). Nous avons montré qu'il pouvait avoir un rôle protecteur sur le développement tumoral pancréatique. Ce projet a pour but de confirmer ces résultats en effectuant des expériences complémentaires et explore une nouvelle voie afin de lutter contre la progression tumorale. Les différentes procédures utilisées dans ce projet nous permettront : 1/ de mieux comprendre le rôle au sein des tumeurs des différents types d'innervation du pancréas, 2/ de caractériser les interactions entre les projections nerveuses et certains composants du microenvironnement. Ces données sont importantes, elles pourraient à terme permettre de contribuer à l'identification d'indicateurs pronostiques pour les patients et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de mettre au point de nouveaux traitements. La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés et de suivre la règle des 3R. Ainsi ce projet utilisera 528 souris génétiquement modifiées. Pour nos expériences, les souris issues des croisements développeront ou pas des tumeurs en fonction des combinaisons d'allèles, on utilise les souris ne développant pas de tumeurs comme contrôle ou pour les expériences d'injections de cellules tumorales. Ainsi nous réduisons le nombre de croisements et d'animaux non utilisés. Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, les études *in vitro* ne permettent pas de récapituler l'ensemble des interactions cellulaires existantes lors du développement des tumeurs. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans

les maladies humaines. En particulier, ils fournissent des modèles de tumeurs pancréatiques qui sont décrits pour récapituler les différentes étapes du développement de la pathologie. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets afin d'enrichir le milieu de vie, et d'augmenter le bien être animal. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être (BEA) des animaux sont contrôlés. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises.

14019 Le cancer colorectal est la troisième cause de cancer dans le monde et la deuxième cause de décès liée au cancer avec 880 792 décès recensés en 2018. Une grande majorité des patients est diagnostiquée tardivement avec 20-25% présentant déjà des métastases, principalement dans le foie et les poumons. Malgré des progrès significatifs dans les approches thérapeutiques, la survie des patients atteints de cancer colorectal métastatique reste faible ; environ 12%, ce qui nécessite le développement de nouvelles approches thérapeutiques. L'une de ces approches est la vaccination par des vecteurs viraux. Cette approche consiste à utiliser des virus modifiés pour induire des réponses immunitaires contre des protéines ayant été identifiées comme étant exprimées par les cellules tumorales.

Notre laboratoire a montré que les vecteurs lentiviraux étaient efficaces pour induire des réponses anti-tumorales sans toxicité pour les autres tissus. Dans plusieurs modèles murins de tumeurs, la vaccination par des vecteurs lentiviraux a pu entraîner le rejet complet des tumeurs entre deux à trois semaines après vaccination.

L'objectif de ce projet est d'appliquer cette approche au cancer colorectal, ce qui n'a pas encore été exploré. Le projet comprend l'identification des antigènes cibles du vecteur vaccinal, l'optimisation de la dose et du protocole d'administration, ainsi que du type de vecteur à utiliser. Nous souhaitons en effet comparer la plateforme de vecteur lentiviraux à d'autres virus modifiés d'intérêt vaccinal, tels que les adénovirus ou les poxvirus.

La finalité de ce projet consiste à démontrer la preuve de concept de la vaccination anti-tumorale par des vecteurs lentiviraux dans des modèles précliniques pertinents, avec pour objectif ultime de transférer cette technologie chez l'Homme lors de futurs essais cliniques. Pour ceci, les modèles animaux sont incontournables. Nous utiliserons pour cette étude des modèles murins C57BL/6 et BALB/c. En effet il a été montré dans des modèles infectieux que les souris C57BL/6 étaient plus enclines à développer des réponses de classe I tandis que les BALB/c développaient plutôt des réponses de classe II. Nos vecteurs ont été construits de telle manière qu'ils puissent induire des réponses de classe I et de classe II chez l'homme. Ces deux modèles de souris sont donc complémentaires et nous permettront d'apprécier au mieux les capacités de nos vecteurs à induire une immunité anti-tumorale polyfonctionnelle. Les souris des deux lignées recevront des cellules tumorales injectées par voie sous-cutanée ou intraveineuse pour développer des tumeurs solides en quelques jours. Les modèles de tumeurs transplantées sont adaptés pour ce projet car bien que l'injection de cellules tumorales d'un certain type (ici colorectal) à un site ectopique (différent de leur site d'origine) ne reproduit pas entièrement le développement de tumeurs humaines dans leur environnement naturel, les tumeurs générées dans ce type de modèle permettent d'étudier la progression tumorale de manière rapide et reproductible et donc d'évaluer rapidement l'efficacité de nouveaux traitements. Les mêmes animaux développant les tumeurs seront ensuite vaccinés en intra-musculaire avec nos constructions virales d'intérêt vaccinal. Des animaux témoins recevront des constructions contrôles ou ne seront pas traités. Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'observer la croissance tumorale et l'état général des animaux. Nous définissons une croissance tumorale maximum de 1500 mm³ afin de minimiser l'inconfort pour les animaux. Pour déterminer l'effet de nos vaccins, les animaux seront sacrifiés à différents temps après l'inoculation de la tumeur et la vaccination, en vue d'analyser la rate, les ganglions et la tumeur.

Dans le respect de la règle des 3Rs, forts de notre expérience antérieure avec d'autres modèles murins de tumeurs, nous diminuerons le nombre d'animaux nécessaires à la validation *in vivo* de notre modèle au minimum de façon à permettre d'interpréter statistiquement des résultats obtenus (Réduire). Par ailleurs, l'identification des cibles de nos vaccins sera effectuée *in silico* par des méthodes de prédictions bio-statistiques et leur validation se fera préalablement *in vitro* lorsque cela sera possible avant de tester nos vecteurs sur les modèles murins de tumeurs (Remplacer). Enfin, les animaux seront suivis quotidiennement pour détecter d'éventuels signes de douleur, souffrance ou stress selon des critères établis préalablement (prostration, faiblesse pour se déplacer ou masse tumorale >1500mm³ par exemple) (Raffiner).

Ce projet comporte 1 procédure légère (96 souris) et 9 procédures modérées (2540 souris) pour un total de maximum 2636 souris.

14020 La dépression est une maladie chronique et invalidante dont les retombées socio-économiques et l'impact sur les familles des malades sont considérables. Elle représente aujourd'hui la pathologie mentale la plus fréquente et sera d'ici 2030 une des pathologies les plus importantes au niveau mondial en termes de santé et de société. En plus du stress chronique, la douleur chronique est un facteur déterminant dans le développement de la dépression puisque près de 50% des patients souffrant d'une douleur chronique présentent également un trouble dépressif. La douleur chronique, définie par la Haute Autorité de Santé comme une douleur persistante et récurrente, qui dure au-delà de ce qui est habituel pour la cause initiale et accompagnée d'une détérioration significative et progressive des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient dans ses activités de la vie journalière, se décline en plusieurs sous-types. Parmi ces sous-types, nous nous intéressons plus particulièrement aux douleurs par excès de nociception, telles que les douleurs neuropathiques, qui est liée à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel. Grâce à l'utilisation de modèles animaux il est aujourd'hui clair que le décours temporel des comportements anxieux et/ou dépressif associés à une douleur chronique est hautement dépendant du type de douleur chronique considéré.

Dans ce contexte, l'intérêt d'alternatives thérapeutiques augmente de façon parallèle à la résistance aux traitements pharmacologiques classiques. Différentes techniques de neurostimulation ont prouvé leur efficacité. La stimulation magnétique transcrânienne, par exemple, est déjà utilisée en clinique mais souffre d'une mauvaise discrimination spatiale. La stimulation cérébrale profonde, quant à elle, permet une résolution spatiale très précise mais requiert une opération chirurgicale lourde avec pose d'électrodes à demeure, contrairement au caractère non-invasif du magnétisme.

La stimulation ultrasonore permet, elle, de créer des champs électriques à la surface corticale et semble pouvoir pallier aux deux limitations précédemment décrites. En effet, elle permet une stimulation non-invasive et précise. Ces champs électriques générés à la surface corticale se traduisent par une dépolarisation neuronale et donc l'induction d'une activité cérébrale, un mécanisme capital dans la thérapeutique des troubles neuropsychiatriques.

Dans un premier temps, nous souhaitons donc mettre en place et valider un dispositif expérimental permettant la stimulation ultrasonore dans un modèle murin de douleur neuropathique. Nous souhaitons, tout d'abord, optimiser les paramètres acoustiques requis pour réaliser une stimulation ultrasonore précise et efficace chez la souris neuropathique ; pour cela nous testerons trois différents temps de stimulations au niveau de deux structures cérébrales différentes reconnues pour être impliquées dans les troubles anxio-dépressifs induits par la douleur neuropathique (le cortex cingulaire antérieur et le noyau accumbens). Puis, nous comparerons l'effet de cette stimulation ultrasonore à celle d'un antidépresseur validé en clinique dans le contexte de la dépression, la fluoxétine.

Le projet nécessitera 384 animaux et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Seules les souris mâles seront étudiées dans le cadre de ce projet, mais nous prévoyons de conduire une analyse dédiée spécifiquement aux souris femelles dans un futur proche. Les résultats seront statistiquement exploitables avec ce nombre d'animaux utilisés.

Remplacer : Au vu de notre thématique d'étude, il nous est impossible de remplacer notre modèle *in vivo* par un modèle *in vitro* ou *in silico*. La caractérisation de la douleur et de sa composante émotionnelle et affective nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire : les expériences seront cependant réalisées avec la volonté de réduire au minimum le nombre d'animaux par condition expérimentale, mais toujours dans l'optique d'obtenir le maximum d'information scientifique par test. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique individuelle, les groupes expérimentaux explorant les comportements de type anxio-dépressif liés aux douleurs chroniques seront constitués de 12 souris par groupe. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés certaines des procédures expérimentales feront partie d'un enchaînement et utiliseront les mêmes animaux, ce qui en réduira grandement l'effectif. Pour cette raison une même cohorte d'animaux sera étudiée et caractérisée au niveau comportemental et émotionnel, puis fera l'objet d'investigations cellulaires.

Raffiner : Les animaux sont hébergés en animalerie dont la température, l'humidité et le cycle jour/nuit sont contrôlés, nourriture et boisson sont disponibles *ad libitum*. Ils seront hébergés en cohorte de 4 à 5 individus pour respecter leurs besoins sociaux. Des carrés de coton seront placés dans la cage pour favoriser la nidation, et des barreaux de bois à ronger pour limiter les comportements d'agressivité. Nous travaillerons en cycle jour/nuit inversé (lumière allumée de 21h à 9h), pour éviter les manipulations durant le temps de sommeil des animaux et ainsi diminuer le stress. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie pré-, per- et post-opératoire. La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté tout au long de la procédure. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche d'évaluation objectivée permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale. En cas de signes de souffrance de l'animal, des soins, une administration d'antalgique ou d'anti-inflammatoire, une séparation (blessures entre congénères) seront réalisés après concertation avec le vétérinaire et/ou la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux.

14021 L'os est capable de s'auto-réparer à condition que la lésion soit de petite taille. Compte tenu du vieillissement de la population, le nombre de fractures conduisant à des pertes massives de tissu osseux ne cesse d'augmenter. De surcroît, les avancées thérapeutiques en orthopédie mettent souvent à mal les capacités naturelles de réparation de l'os. En effet, le traitement de tumeurs, de kystes etc., nécessite souvent l'enlèvement de pièces osseuses de taille trop importante pour que le processus naturel d'auto-réparation puisse, à lui seul, induire une consolidation osseuse. Le comblement de ces défauts est généralement assuré par des greffes. Cependant, leur utilisation présente des inconvénients majeurs comme le volume disponible et une morbidité importante.

Les techniques d'ingénierie tissulaire, de façon plus précise, l'implantation d'un scaffold (matrice) pour promouvoir la régénération tissulaire ont ouvert une voie de développement de thérapeutique substitutive à la pratique du greffage. En effet, le design et la fabrication des scaffolds permettent de se rapprocher le plus possible des structures d'origine, en offrant les propriétés intrinsèques quasi équivalentes: résistance, porosité, élasticité. Ainsi, les cellules réparatrices peuvent aisément coloniser le scaffold et y loger pendant tout le processus de réparation.

Notre équipe a développé des nanoscaffolds à base de substances naturelles comme la bagasse, l'Aloe Vera, la canne à sucre, et les algues marines avec un enrichissement en hydroxyapatite, principal constituant des os et en laponite, nanosilica, qui permettent de renforcer les nanoscaffolds. Les études *in vitro* montrent une absence de toxicité et une excellente biocompatibilité, ainsi que des propriétés mécaniques très proches de celles de l'os. Cependant, nous devons effectuer des études *in vivo* pour mettre les scaffolds à l'épreuve sur un organisme vivant avec toutes les tensions/pressions qu'il génère.

Nous proposons d'utiliser les scaffolds pour améliorer la régénération osseuse d'un défaut osseux critique de calvaria (os du crâne) chez le rat. Pour cela, nous utiliserons des rats femelles et mâles adultes Wistar.

Le modèle de défaut osseux critique de calvaria chez le rat est connu et bien décrit dans la littérature. L'Equipe de l'animalerie possède une bonne expertise de la chirurgie osseuse et ils ont dans leur laboratoire tout le matériel nécessaire pour réaliser ce modèle animal: appareil d'anesthésie gazeuse, microscopes chirurgicaux, plateaux chauffants, instruments de microchirurgie. Nous utiliserons 2 rats par expérimentateur pour mettre au point le modèle animal afin d'être reproductible dans nos expériences.

Nous allons tester 10 scaffolds différents provenant de la flore tropicale (Aloe Vera, la canne à sucre, algues marines). Ceux-ci seront également enrichis en metformin, hydroxyapatite, laponite, nanosilica pour évaluer l'amélioration de la régénération osseuse. Nous évaluerons l'effet des scaffolds sur la régénération osseuse sur 2 temps différents après leurs implantations: 8 et 16 semaines. Le premier temps permettra d'évaluer la cicatrisation osseuse avec analyse histologique, et le deuxième temps de 16 semaines permettra d'évaluer l'évolution du tissu cicatriciel dans le temps. Nous allons tester 10 scaffolds différents provenant de la flore tropicale (Aloe Vera, la canne à sucre, algues marines). Ceux-ci seront également enrichis en (1) sans enrichissement (2) hydroxyapatite et metformin ou (3) laponite et metformin ou (4) nanosilica et laponite ou (5) avec de l'hydroxyapatite et laponite. Parmi les 10 scaffolds sans enrichissement, un contrôle positif (scaffold commercialisé e. g. (OsSatura, IsoTis, The Netherlands) et négatif (sans scaffold) seront aussi inclus. En effet, pour au moins 2 scaffolds, nous n'étudierons pas la condition "sans enrichissement" car cela n'a aucun intérêt, au vu des résultats *in vitro*. Cette étude comprendra de $10 \times 2 \times 5 = 100$ conditions différentes (10 scaffolds, 2 temps, et 5 possibilités d'enrichissement). Nous répéterons 3 fois chaque condition, ce qui est un minimum pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous avons ainsi besoin d'un total de $3 \times 100 = 300$ échantillons de scaffolds. Nous pouvons implanter 1 scaffold par rat, nous avons besoin de 300 rats Wistar pour cette étude. Le projet utilisera donc un total de 304 rats Wistar (4 rats de l'étude pilote).

3R : Remplacement : Nous avons déjà réalisé des tests cellulaires concernant la cicatrisation sur des cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes). Pour répondre à notre objectif scientifique, nous avons besoin d'un animal vivant pour étudier tout le processus cicatriciel dans son ensemble, avec les contraintes que l'os subit au quotidien (mouvement, étirement, inflammation locale...). Réduction : l'utilisation de l'imagerie nous permet de suivre la cicatrisation osseuse sans avoir besoin de sacrifier l'animal. Pour certains scaffolds, nous n'étudierons pas la condition "sans enrichissement" car cela n'a aucun intérêt, au vu des résultats *in vitro*, ce qui nous permet de diminuer le nombre d'animaux. Ainsi le chiffre de 304 ne sera sûrement pas atteint. Raffinement : l'étude pilote nous permettra de définir un protocole optimisé, en observant le comportement des animaux par rapport aux plaies induites. Nous pourrions également déterminer des points limites encore plus précis. Le modèle de lésion osseuse présenté est un modèle décrit dans la littérature et peu douloureux : cette région anatomique est très peu innervée. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale (isoflurane) et avec une couverture analgésique (buprénorphine 0.05 mg/kg). Les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour et seront manipulés tous les jours pour détecter tout inconfort lié à la procédure.

14022 Les patients hémophiles (déficience en facteur VIII ou IX) ou patients déficients en facteur von Willebrand ont non seulement des troubles de la coagulation mais présentent également une ostéopénie, une sarcopénie et des altérations du processus inflammatoire. Cependant, le lien fonctionnel entre ces déficits moléculaires et l'impact sur le tissu musculo-squelettique et l'inflammation ne sont pas ou peu connus. Ces pathologies étant des maladies rares orphelines, il est nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux (souris) mimant la pathologie humaine pour pouvoir mieux comprendre l'impact de la déficience de ces facteurs et de proposer des approches thérapeutiques complémentaires. Ce projet a pour objectifs : 1) de caractériser les réseaux moléculaires modulés par la déficience en facteurs de coagulation ; 2) de caractériser l'impact des facteurs de coagulation sur les pertes osseuses, musculaires et les populations immunitaires ; 3)

de comprendre le lien fonctionnel entre les facteurs de coagulation et les cytokines impliquées dans le remodelage musculo-squelettique : 4) de tester l'efficacité de monothérapie anti-catabolisme et pro-anabolisme osseux ou bithérapie associant un traitement anti-catabolique et pro-anabolique sur les pertes osseuses observées chez les souris hémophiles en vue d'une application potentielle chez l'homme. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative. Pour cela, les procédures proposées incluent un suivi longitudinal des animaux par imagerie non invasive et un plan statistique pour les approches thérapeutiques. Un nombre maximal de 5 molécules anti-cataboliques et 5 molécules pro-anaboliques sera étudié sur une période de 5 ans. Un nombre maximal d'environ 1772 souris est prévu sur cette même période. Le bien être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis (développés ci-dessous).

14023 Les glioblastomes sont les tumeurs du système nerveux central les plus agressives, cependant aucun traitement efficace n'est à ce jour disponible. Ces tumeurs sont tout particulièrement difficile à traiter car elles sont très hétérogènes en cellules. En plus de contenir des cellules tumorales, ces tumeurs sont composées de vaisseaux et de cellules immunitaires qui favorisent la croissance tumorale et modifient la réponse au traitement. Afin d'améliorer l'efficacité des traitements et ainsi la survie des personnes atteintes de cette tumeur, notre hypothèse de travail est d'utiliser des molécules qui agiraient sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules de l'environnement de la tumeur. Par ailleurs, les glioblastomes surexpriment des protéines qui entraînent une résistance au traitement dont les inhibiteurs de l'apoptose. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés aux molécules qui bloquent les inhibiteurs de l'apoptose appelées les mimétiques de Smac. Au laboratoire, nous avons montré que ces mimétiques de Smac en plus de sensibiliser les cellules au processus d'élimination cellulaire, agissent sur les vaisseaux de la tumeur et sur les cellules du système immunitaire périphérique. Cette étude a pour objectif de comprendre quelle(s) population(s) cellulaire(s) du système immunitaire est impactée par le traitement au mimétique de Smac. Pour cela nous allons rendre les cerveaux traités ou pas transparents afin d'analyser l'organisation 3D des tumeurs et déterminer exactement quelles cellules immunitaires sont présentes au site tumoral en effectuant de la cytométrie de masse. Des cellules de glioblastomes d'origine murine (GL261-DsRED) seront greffées en intracérébral dans des souris C57BL6. Un total de 90 souris sera nécessaire pour une durée de 5 ans : 40 souris seront utilisées pour les tests de cytométrie de masse et 50 pour les expériences de clarification de cerveaux. Les animaux seront traités 1 fois par semaine en intra-veineux à la dose de 20 mg/kg et le début du traitement commencera une semaine après greffe. Pour les expériences de clarification une cinétique sera effectuée et les cerveaux seront récupérés après 15, 21 et 28 jours post greffe (10 souris pour chaque temps comprenant 5 traitées au GDC-0152 et 5 contrôle). Pour la cytométrie de masse les cerveaux seront récupérés après 21 et 28 jours post-greffe (5 souris traitées au GDC-0152 et 5 souris contrôle). Les autres animaux serviront pour les mises au point. Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévu est minimum et suffisant dans chaque groupe. Il est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées selon les normes requises avec un enrichissement (coton, rouleau de carton) et en groupes de 5 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Les souris seront surveillées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine. Une analgésie péri-opératoire sera effectuée afin d'éviter la douleur. Le suivi général de l'état de l'animal sera assuré ainsi que le niveau de souffrance évalué en fonction d'une grille de score. Les animaux seront mis à mort dès l'apparition d'un signe de détresse. Le remplacement de ces expériences conduites chez l'animal n'est pas possible car elles nécessitent un être vivant.

14024 L'ataxie autosomique récessive cérébelleuse 2 (ARCA2) est un syndrome héréditaire rare qui se caractérise par une ataxie cérébelleuse progressive débutant dans l'enfance, parfois associé à une intolérance à l'exercice avec élévation modérée des lactates, un déficit intellectuel léger, ou des crises épileptiques. Le syndrome est dû à des mutations du gène COQ8A, un gène qui semble avoir un rôle dans la biosynthèse de l'ubiquinone (Coenzyme Q10). Les patients ARCA2 présente en effet un déficit en ubiquinone. A ce jour, nous ne connaissons pas les voies physiopathologiques impliquées dans cette maladie, ce qui prévient de comprendre l'hétérogénéité des symptômes chez les patients. Par ailleurs, aucune approche thérapeutique n'est disponible pour ARCA2.

Nous avons généré dans le laboratoire un modèle murin de la pathologie par délétion constitutive d'COQ8A. Ce modèle reproduit plusieurs symptômes associés à ARCA2. Le phénotype, modéré et très progressif, se développe entre 5 et 30 semaines. En effet, au niveau du cervelet, seules les cellules de Purkinje ont été identifiées comme atteintes lors de nos analyses histologiques et biochimiques au cours des dernières années. Une atteinte du cervelet pourrait expliquer l'ataxie cérébelleuse. Ces souris constituent donc un bon modèle pour comprendre la physiopathologie de la maladie et pour tester des approches thérapeutiques.

L'objectif de notre projet est d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'une molécule (b-lactames) qui agit spécifiquement sur les voies biochimiques impliquées dans le dysfonctionnement des cellules de Purkinje. Si la molécule est efficace, les souris mutantes porteuses de la maladie ARCA2 devraient voir leur état amélioré.

La première partie du projet consistera à déterminer la dose optimale à administrer aux souris pour observer un effet au niveau moléculaire. Nous testerons 3 doses différentes ainsi que la solution dans la laquelle notre molécule thérapeutique potentielle est dissoute.

Ensuite, une fois la dose efficace déterminée, le traitement sera administré aux souris et ces dernières seront suivies jusqu'à l'âge de 30 semaines. L'efficacité du traitement sera évaluée par des tests de comportements, selon des protocoles préétablis dans notre laboratoire, et par des études moléculaires et histologiques sur tissus des souris traitées, prélevés après leur euthanasie.

Au total, nous aurons besoin de 136 souris pour mener à bien ce projet.

Remplacement :

L'utilisation d'un organisme entier complexe tel que la souris est indispensable pour l'étude de la physiopathologie d'ARCA2. En effet, aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut s'y substituer actuellement. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité de notre molécule candidate dans un modèle souris, qui récapitule fidèlement les caractéristiques de la maladie.

Réduction :

Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux estimé pour avoir des résultats scientifiquement interprétables. Dans le but d'utiliser l'ensemble des animaux produits et de prendre en compte une éventuelle dysmorphie sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement :

Les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin du projet. Le traitement consiste en 1 injection/jour pendant 5 jours et ne devrait pas entraîner de douleur. Cela étant, les sites d'injection seront particulièrement surveillés lors du suivi quotidien des animaux. Un enrichissement sera mis dans chaque cage d'hébergement. Les tests de comportement ne sont ni douloureux ni invasifs. Aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Malgré tout, dans le cas où une souris présenterait des signes de souffrance, de mal-être, ou de douleur, elle sera exclue des tests et soignée. Si son état ne devait pas s'améliorer, l'animal sera euthanasié.

14025 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), qui comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont en constante augmentation dans les pays développés et en forte incidence dans les pays émergents. Ces maladies se caractérisent par une inflammation chronique de la paroi du tube digestif liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif. Elles

sont le plus souvent diagnostiquées chez des jeunes sujets de 20 à 30 ans et ont un réel impact négatif sur la qualité de vie des patients. La maladie fonctionne souvent par la succession de poussées inflammatoires et de périodes de rémission plus ou moins longues. Les causes de ces pathologies récentes ne sont pas connues. Des causes environnementales liées au mode de vie occidental (nourriture, pollution, pesticides) associées à une susceptibilité génétique des patients sont suspectées. Il n'existe aucun traitement curatif et l'arsenal thérapeutique actuel n'agit que de façon suspensive. Les traitements actuels ciblent essentiellement les dérèglements du système immunitaire sans action sur l'initiation du dysfonctionnement.

Le but de ce projet est de tester de nouvelles approches thérapeutiques en ciblant des acteurs précoces responsables de l'initiation de l'inflammation. L'identification d'un de ces acteurs a permis de développer des anticorps spécifiques susceptibles de bloquer les phases d'initiation de l'inflammation. Nous nous proposons de tester l'efficacité anti-inflammatoire et régénérative (en vue d'une reconstitution complète du tissu lésé) de ces anticorps sur un modèle de souris reproduisant les symptômes des MICI.

Dans l'expérimentation proposée, les souris seront âgées de 6-7 semaines provenant d'un fournisseur agréé. Cent quatre-vingt souris seront nécessaires pour ce projet prévu pour une durée de 36 mois. Après une semaine d'adaptation, le traitement par un inducteur d'inflammation colique (DSS) dans l'eau de boisson sera prolongé pendant une semaine et/ou poursuivi par deux semaines de récupération (sans inducteur) selon les protocoles publiés et couramment utilisés. Les procédures consisteront à traiter les souris par les différents anticorps à disposition (4 anticorps validés quant à leur efficacité *in vitro*) soit pendant les 7 jours de traitement par l'inducteur soit après une et deux semaines de récupération sur différents groupes de souris. Les souris de l'ensemble des groupes concernés seront euthanasiées soit à Jour 7 pour l'évaluation de l'inflammation, soit à Jour 14 et Jour 21 pour les groupes de récupération. L'euthanasie pourra être anticipée si des signes de mauvaise tolérance ou de souffrance avérée apparaissent en accord avec le score clinique préétabli (point limite).

Les analyses statistiques nous permettront de définir le retentissement clinique des traitements par les différents anticorps et de sélectionner le meilleur anticorps pour une application future chez l'homme.

Notre approche expérimentale est en adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : il est impossible d'évaluer l'effet thérapeutique d'anticorps sur un modèle *in vitro* ou *in silico*. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire la complexité d'une colite, et seul le modèle animal permet de conduire ce projet. La souris est le plus petit animal adapté à ce travail avec une littérature validant ce choix

Réduire : L'effectif proposé tient compte de la mortalité possible liée à l'induction de la colite et du fait qu'un effectif plus faible ne permettrait pas de démontrer une différence statistique significative.

Raffiner : Les souris seront surveillées quotidiennement. Les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur seront adaptées en fonction de l'état des animaux (analgésie et suivi des signes de mieux/mal être). Les effets du traitement seront contrôlés par des pesées et une surveillance selon un score standardisé de colite clinique. Ce score correspond à une grille d'évaluation clinique permettant de prendre des mesures progressives en fonction de l'élévation du score (augmentation de la fréquence des observations, administration de solution saline pour lutter contre la déshydratation, administration d'anesthésiant pouvant être renouvelé toutes les 12h, euthanasie précoce). Ainsi, le protocole expérimental pourra être atténué voire suspendu en cas de mauvaise tolérance ou de souffrance des animaux : l'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, maisons, cycle jour/nuit).

14026 La structure acoustique des vocalisations de mammifères terrestres est étonnamment complexe et diversifiée. Comprendre les forces évolutives qui façonnent cette diversité dans un contexte comparatif entre les espèces constitue un objectif crucial de la recherche en bioacoustique.

Des travaux récents ont révélé que des éléments clés de l'anatomie de l'appareil vocal humain ont évolué indépendamment chez d'autres espèces de mammifères. Sous l'effet de la sélection sexuelle, on retrouve chez certaines espèces des dispositifs anatomiques et des mécanismes permettant l'exagération vocale de la taille corporelle. Cette dernière contribue à l'établissement de la dominance et permet l'accès à la reproduction. Par exemple, comme les humains, les mâles de plusieurs espèces de mammifères ont développé des larynx de taille disproportionnée leur permettant de produire des appels avec une fréquence fondamentale disproportionnée (F0). De même une mobilité forte de l'appareil vocal leur permet de produire des appels avec des résonances démesurément basses et modulées (formants), pour donner une impression exagérée pendant la compétition sexuelle. Ces adaptations augmentent les gammes de F0 et de formants (deux composants acoustiques clés de la parole humaine) disponibles pour les individus et permettent de meilleures capacités de contrôle vocal. En effet, la modulation de F0 et des fréquences de formants peuvent être utilisées comme signaux secondaires de motivation, pour signaler une agression ou une subordination.

Un certain nombre de travaux nous ont permis de préciser ces mécanismes chez les cervidés polygames (Cervinae, groupe de mammifères caractérisé par une diversité unique d'anatomies vocales et de signaux vocaux). Nous avons notamment décrit les caractéristiques anatomiques et acoustiques chez le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) (qui a un larynx sexuellement dimorphique, élargi et descendu) et le cerf sika (*Cervus nippon*) (qui n'a pas d'appareil vocal sexuellement dimorphique) ainsi que la capacité des femelles des deux espèces à discriminer ces vocalisations.

Nous souhaitons désormais préciser les effets des androgènes sur le développement de l'appareil vocal pour ces deux espèces. Plus spécifiquement, nous testerons les effets de la testostérone exogène sur le développement et la descente du larynx et si possible les caractéristiques acoustiques chez le mâle élaphe et sika (vocalisations). Les changements anatomiques au cours de la croissance des animaux et leur dépendance vis-à-vis des androgènes seront caractérisés par l'utilisation de scanners CT (Computer Tomography) effectués de façon longitudinale au cours du développement des individus (âgés de 6, 18 et 30 mois). Dans ce but, 18 cerfs élaphe et 10 cerfs sika seront utilisés (28 animaux au total). Chez le cerf élaphe (larynx dimorphique), 4 lots expérimentaux (lot contrôle, n=5 ; lot castré, n=5 ; lot castré supplémenté en testostérone en concentration physiologique n=4 ; lot castré supplémenté en testostérone en concentration supra physiologique, n=4) de mâles âgés de 6 mois en début d'expérimentation seront constitués.

Chez le cerf sika (espèce dont le larynx est non dimorphique), 10 animaux âgés de 6 mois en début d'expérimentation seront utilisés en 2 lots (lot contrôle, n=5 ; lot castré, n=5). Ce projet a fait l'objet d'une évaluation scientifique et d'un financement (IDEX).

Remplacement: il n'existe pas d'approche alternative permettant le remplacement du modèle animal dans notre contexte expérimental.

Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux nécessaire (18 cerfs élaphe et 10 cerfs sika) a été évalué sur la base de travaux déjà réalisés chez les cervidés par nos laboratoires. De même, des travaux publiés chez le mouton (espèce moins dimorphique que le cerf élaphe) mettant en évidence un rôle discret des androgènes (testiculaires ou exogènes) sur le développement du tractus vocal ont été utilisés comme référence pour établir les lots et nombres d'individus de notre étude. Les approches d'imagerie utilisées dans le projet sont non invasives et permettent un suivi longitudinal. Ce suivi longitudinal contribue à la réduction du nombre d'animaux nécessaire à l'étude.

Raffinement : Un entraînement spécifique de type medical training (renforcement positif) sera réalisé sur les animaux pour faciliter la contention et réduire le stress lors des manipulations (prises de sang, anesthésies). Les approches d'imagerie utilisées dans le projet sont non invasives.

- 14027** L'état de santé d'un individu est influencé par deux grandes composantes :
- son génome, lié au caractère génétique de l'individu
 - et son « exposome », lié à l'environnement dans lequel l'individu évolue.

L'exposome désigne l'ensemble des facteurs de l'environnement auquel l'Homme est exposé, de sa naissance jusqu'à sa mort. Ainsi, l'étude de l'exposome vise à comprendre les facteurs de risques (non génétiques) favorisant l'apparition de maladies chroniques comme, le diabète, les cancers ou l'asthme.

Aujourd'hui, le concept « d'exposome » représente un nouveau défi pour les immunologistes car son analyse est encore plus complexe que l'analyse du génome. En effet, étudier l'exposome d'un individu nécessite la prise en compte d'une infinité de variables : par exemple, les facteurs externes comme les expositions chimiques (particules fines, polluants, etc...), les facteurs internes comme le microbiote, les facteurs liés au mode de vie (tabac, alimentation, stress...), mais aussi bien d'autres paramètres dont l'exposition à une variété de pathogènes présents dans l'environnement (virus, bactéries, parasites). Cette exposition aux microbes de l'environnement façonne notre système immunitaire ; et à mesure que nous grandissons ; notre profil immunitaire est modifié. En effet, au cours de sa vie, l'Homme est infecté par une quantité d'agents pathogènes aigus et chroniques. Il en est probablement de même chez la souris. Pourtant, les souris de laboratoire utilisées pour les études biomédicales sont maintenues dans des environnements « ultra-propre » et aseptisé.

Récemment, des études ont montré que des souris qui vivent dans un milieu sauvage possèdent un système immunitaire présentant des caractéristiques similaires à celui d'humains adultes, contrairement aux souris de laboratoire, qui présentent elles, un système immunitaire plus proches d'un nouveau-né. Ces données suggèrent ainsi que le système immunitaire des souris de laboratoire n'est pas représentatif de celui d'un homme adulte contrairement à celui de souris issues de milieu sauvage. Aujourd'hui, la prise en compte de ces expositions environnementales pourrait donc clairement améliorer les modèles murins actuellement indispensables aux études pré-cliniques ou pour le développement de vaccins et de traitements thérapeutiques.

Dans cette objectif, ce projet de recherche vise à déterminer l'impact sur le système immunitaire, d'une exposition à différents pathogènes, qui mimerait les infections qui surviennent chez les êtres humains au cours de leur vie (parasite, virus, bactérie). Cette étude permettra de mieux comprendre les réponses immunitaires anti-infectieuses mais également d'étudier les caractéristiques fonctionnelles d'un système immunitaire « exposé » reflétant plus justement le système immunitaire humain. Par ailleurs, l'impact de ces infections sur le microbiote sera évalué. En effet, il a déjà été clairement montré que le microbiote influence les réponses immunitaires et inflammatoires, cependant l'impact de différentes infections sur la composition et la dynamique du microbiote est actuellement mal comprise.

La réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale particulière, ce qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*. Ce projet nécessitera l'utilisation de 300 souris au maximum. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats. De plus, plusieurs questions pourront être posées en parallèle, sur les mêmes groupes d'animaux afin de réduire leur nombre.

Les doses des différents pathogènes utilisés dans cette étude (parasite, virus, bactérie) sont réduites au minimum permettant d'induire une réponse immunitaire (dose immunisante). Aucun symptôme clinique n'est attendu et les souris seront surveillées quotidiennement suite à chacune des immunisations. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

14028 La peau peut subir des dommages lors de chirurgies, brûlures, radiations, et coupures. Si la lésion cutanée est trop grande et profonde, le processus naturel d'autoréparation ne peut pas, à lui seul, régénérer le tissu. La réparation est alors assurée par des greffes de peau qui présentent de nombreux inconvénients comme le volume disponible, et une morbidité importante. De plus, les mécanismes de la régénération tissulaire des plaies durant la cicatrisation peuvent être compromis par des affections métaboliques comme le diabète.

Les techniques d'implantation d'un scaffold (matrice) pour promouvoir la réparation/ régénération tissulaire permettent le développement d'une voie thérapeutique substitutive à la pratique de la greffe. L'utilisation des polymères d'origine naturelle est préférable pour la fabrication des nanoscaffolds en raison de leur ressemblance avec les protéines présentes dans la matrice extracellulaire.

Nous avons développé des nanoscaffolds à base de substances naturelles comme l'Aloe Vera, la canne à sucre, et les algues marines avec un enrichissement en curcumin (Cur) et en Metformin. Les études *in vitro* et *in vivo* montrent une excellente biocompatibilité, ainsi que des propriétés mécaniques très proches de celles de la peau. Cependant, nous devons effectuer des études *in vivo* de régénération tissulaire des plaies cutanées pour mettre les scaffolds à l'épreuve sur un organisme vivant avec toutes les tensions/pressions qu'il génère, ainsi qu'un système immunitaire actif.

Nous proposons d'utiliser les scaffolds pour améliorer la régénération tissulaire des plaies cutanées chez des rats diabétiques et non-diabétiques. Pour cela, nous utiliserons des rats adultes Wistar. Le diabète sera induit chimiquement chez certains rats par injection de streptozotocine.

Nous réaliserons une étude pilote sur 21 jours et pour cela nous utiliserons 8 rats, qui nous permettra d'optimiser les conditions pour l'étude principale.

Nous évaluerons l'effet des scaffolds sur la régénération de la peau 21 jours après leurs implantations sur les plaies cutanées en conditions diabétiques et non-diabétiques. Nous allons tester 10 scaffolds différents fabriqués à partir de matière première provenant de la flore tropicale (Aloe Vera, la canne à sucre, algues marines). Ceux-ci seront également enrichis en (1) sans enrichissement (2) Metformin (3) Curcumin (cur) et Metformin. Cette étude comprendra de $10 \times 3 \times 2 = 60$ conditions différentes (10 scaffolds, 2 types de plaies (diabétiques et non diabétiques) et 3 possibilités d'enrichissement). Nous répéterons 5 fois chaque condition, ce qui est un minimum pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous avons ainsi besoin d'un total de $5 \times 60 = 300$ échantillons de scaffolds. Nous pouvons implanter 4 scaffolds par rat, nous avons besoin de 76 rats Wistar pour cette étude (38 rats non-diabétiques et 38 rats diabétiques). Le projet utilisera donc un total de 84 rats Wistar (avec les 8 rats de l'étude pilote).

Ce nombre ne sera surement pas atteint, car les scaffolds/enrichissement qui n'auront pas d'effet significatif sur la cicatrisation des rats non diabétiques ne seront pas étudiés sur les rats diabétiques.

3R : Remplacement : Nous avons déjà réalisé des tests cellulaires concernant la cicatrisation sur des cellules épithéliales. Pour répondre à notre objectif scientifique, nous avons besoin d'un animal vivant pour étudier tout le processus cicatriciel dans son ensemble, avec les contraintes que la peau subit au quotidien (mouvement, étirement, inflammation locale...). Réduction : nous avons réduit au maximum l'utilisation des animaux. Nous avons choisi de diminuer à 6mm la taille des plaies induites, afin de pouvoir étudier 4 scaffolds par rat. Ainsi nous diminuons par 4 le nombre d'animaux. Le nombre ne sera surement pas atteint, car les scaffolds/enrichissement qui n'auront pas d'effet significatif sur la cicatrisation des rats non diabétiques ne seront pas étudiés sur les rats diabétiques. Raffinement : notre protocole a été optimisé afin de minimiser au maximum les contraintes subies par les animaux. L'étude pilote nous permettra de définir un protocole optimisé, en observant le comportement des animaux par rapport aux plaies induites, notamment par la présence de l'attelle. Nous pourrions également déterminer des points limites encore plus précis. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et avec une couverture analgésique. Les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour et seront manipulés tous les jours pour détecter tout inconfort lié à la procédure.

14029 Contexte :

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Il a été précédemment démontré que le taux d'expression du gène *Nxn12* était un facteur de prédisposition à la maladie d'Alzheimer.

Les deux gènes, *Nxnl1* et *Nxnl2*, codent pour des facteurs impliqués dans la survie des photorécepteurs à cônes au niveau de la rétine (*RdCVF1* et *RdCVF2*). *RdCVF1* a un rôle connu dans la stimulation de l'uptake de glucose par les cônes rétinien et leur métabolisme glycolytique. Contrairement au gène *Nxnl1*, l'expression du gène *Nxnl2* n'est pas restreinte aux photorécepteurs. *Nxnl2* s'exprime dans d'autres régions du système nerveux central, et son produit *RdCVF2* pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la glycolyse dans ces régions. Une étude sur un modèle rongeur qui n'exprime pas le gène *Nxnl2* et qui présente un phénotype cognitif et comportemental altéré a notamment montré une accumulation de produits de la dégradation du glucose dans le cerveau, suggérant une altération métabolique.

D'autre part, il a récemment été montré chez l'homme que des dérèglements du métabolisme cérébral étaient associés à la maladie d'Alzheimer. En particulier, il a été montré que les zones du cerveau les plus touchées par la maladie d'Alzheimer chez les patients correspondent à des zones qui présentent un fort découplage entre les taux de consommation de glucose et d'oxygène chez les personnes saines. Ce phénomène est connu sous le nom de glycolyse aérobie non oxydative.

Objectif du projet :

Dans la présente étude, nous nous proposons de déterminer le lien entre l'expression du gène *Nxnl2* et la glycolyse aérobie non oxydative. Ce phénomène sera évalué grâce à une combinaison d'imagerie TEP du glucose marqué en fluor 18 (mesure du taux de consommation du glucose) et d'imagerie RMN de l'oxygène 17 (mesure du taux de consommation d'oxygène mitochondrial). Ces deux techniques seront tout d'abord mises au point chez la souris saine. Nous les utiliserons ensuite pour caractériser une lignée de souris qui n'expriment pas le gène *Nxnl2*, puis nous évaluerons les effets traitement par thérapie génique ayant pour action une réexpression des produits du gène *Nxnl2*. Les résultats de l'étude permettront de déterminer si :

- (1) l'absence de *Nxnl2* induit ou non une diminution de la glycolyse aérobie non oxydative, et
- (2) l'anomalie métabolique peut être corrigée par une approche de type thérapie génique.

Les mesures par imagerie métabolique (TEP et RMN) seront réalisées *in vivo* sous anesthésie. Les données de la littérature montrent que les modalités d'anesthésie ont une large influence sur le métabolisme énergétique du glucose et de l'oxygène et sur la réactivité vasculaire cérébrale chez la souris. De plus, différents protocoles d'anesthésie peuvent avoir une efficacité et/ou des effets métaboliques variables en fonction de la souche et du modèle de souris utilisé. Pour cette raison, le projet prévoit une étude préliminaire de l'effet de l'anesthésie selon plusieurs protocoles mis au point avec l'aide des vétérinaires.

Recours à l'animal :

Les modèles rongeurs utilisés dans cette étude reproduisent le phénotype humain de la maladie d'Alzheimer. Le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet car aucun système de culture de cellules *in vitro* ni aucune simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du métabolisme énergétique du cerveau. Seule une approche *in vivo* permettra d'évaluer les interactions entre l'apport de glucose et d'oxygène par le réseau vasculaire, l'intégration du glucose dans la cellule et le fonctionnement de la respiration mitochondriale.

Les animaux sont hébergés selon les normes réglementaires en vigueur. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement tout au long du projet et l'application de critères d'arrêts permet de veiller au bien-être des rongeurs.

Le nombre maximum d'animaux utilisés pour ce projet sera de 420 souris. Ce chiffre a été calculé sur la base de 30 animaux par groupe expérimental. Cette taille de groupe a été déterminée sur la base de notre expérience de la variabilité inter-animal des mesures par imagerie TEP et RMN de manière à pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes expérimentaux.

14030 Les ulcérations chroniques représentent une forte morbidité chez les patients diabétiques et sclérodermiques par la diminution de leur qualité de vie et peut conduire à une amputation dans les cas graves. La microcirculation est un élément central de la cicatrisation des plaies chroniques

comme celles retrouvées dans le diabète et la sclérodémie systémique. L'administration topique de principes actifs permet d'améliorer la tolérance systémique du traitement tout en augmentant l'efficacité locale. Le passage sanguin d'un médicament lors d'une application sur un ulcère est fortement augmentée ce qui diminue l'action locale recherchée. Il faut donc des formulations permettant d'administrer de manière contrôlée la quantité de médicament sur un temps donné.

Ce projet a pour objectif de caractériser l'action d'un principe actif lors d'une application sur une plaie afin de caractériser son effet sur la microcirculation dans différentes formulations.

Cette étude permettra de choisir parmi différentes formulations pour des études ultérieures sur la cicatrisation.

Dans le premier protocole, une application locale du traitement sera réalisée et une évaluation du flux sanguin sera réalisée lors d'une administration sur 4 h. Le second protocole vise à caractériser le passage sanguin et tissulaire de l'administration en fonction des différentes formulations.

Nous avons choisi de travailler sur un modèle de souris car pour ce type d'étude il nous est impossible de remplacer l'animal (cellules cultivées, peau de synthèse, simulation informatique) pour représenter au mieux l'étape de cicatrisation et la microcirculation. Ce projet utilisera au maximum 332 souris. Ce projet nous permettra de sélectionner une formulation pour une étude ultérieure sur des modèles de cicatrisation diabétique. Les animaux seront suivis et traités avec un traitement analgésiant adapté aux manipulations réalisées et des points limites adaptés afin de raffiner leur utilisation.

14031 La contraception majoritairement utilisée chez les humains est basée sur l'utilisation de traitements hormonaux oestro-progestatifs dont certains effets délétères sur la santé ont été démontrés. C'est pourquoi des méthodes non hormonales de contraception sont recherchées. Des travaux préliminaires *in vitro* ont montré que l'ajout d'un sucre au mucus vaginal était capable d'agglutiner ce mucus et d'augmenter sa viscosité. Cela permettrait potentiellement de bloquer la mobilité des spermatozoïdes émis dans le vagin, les empêcher de traverser le col de l'utérus et donc bloquer la fécondation. Avant de tester cette méthode chez l'humain, des essais chez l'animal sont requis. La brebis est un excellent modèle biologique d'étude de l'impact de la viscosité du mucus cervical sur le passage des spermatozoïdes à travers le col de l'utérus. Le col de l'utérus de brebis est couvert d'un mucus qui effectue une sélection efficace des spermatozoïdes. Seuls 1 % des spermatozoïdes déposés dans le vagin atteindront l'utérus. La jument est également un bon modèle biologique car la morphologie du col de l'utérus de la jument est proche de celle de la femme. L'utilisation conjointe des 2 modèles biologiques permettra de simuler le modèle humain.

Cette étude consiste à appliquer le composé contraceptif dans le vagin de brebis (40) et de juments (5), réaliser une insémination en déposant la semence dans le vagin et quantifier le passage des spermatozoïdes dans l'utérus par imagerie.

Le nombre d'animaux inclus dans l'étude (51: 45 femelles et 6 mâles (3 étalons et 3 béliers)) et les procédures expérimentales ont été choisies afin de respecter au maximum les pratiques des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement). Réduction: Les effectifs d'animaux ont été réduits au minimum pour quantifier le passage des spermatozoïdes dans l'utérus par imagerie. Remplacement: Le passage des spermatozoïdes à travers le col de l'utérus est un mécanisme complexe et mal connu, qui doit être étudié sur animal vivant. Raffinement : Les animaux sont logés en bâtiment conventionnel sur aire paillée avec accès au pâturage, en visibilité et contact des congénères. Les animaux seront prélevés sur le site d'élevage afin d'éviter tout stress de déplacement et modification d'hébergement.

14032 Optimiser la fonction visuelle est indispensable aux animaux pour s'adapter aux variations cycliques de leur environnement telle que l'alternance jour/nuit. Cette optimisation est rendue possible grâce à l'existence dans la rétine d'une horloge endogène synchronisée par l'alternance jour/nuit qui régulent le fonctionnement rythmique de la rétine. Cette horloge est en réalité un réseau d'oscillateurs présents dans différents types de neurones rétinien qui sont fortement connectés entre eux. Les mécanismes par lesquels ces oscillateurs communiquent entre eux sont peu connus

et en particulier le rôle des cellules gliales de Müller (CGM), cellules de soutien aux neurones, dans ce réseau, n'ont pas été étudiés. Il a été récemment démontré que les CGM contiennent également une horloge et que les fonctions rythmiques des cellules gliales vis-à-vis de l'horloge rétinienne mais aussi de la fonction visuelle, analysée par électrorétinographie sont indispensables. Les CGM expriment des systèmes d'absorption et d'échanges pour divers neurotransmetteurs, y compris le glutamate, neurotransmetteur principal de la rétine. Ce projet a pour objectif donc d'analyser si le glutamate est impliqué dans l'interaction entre l'horloge des CGM et les autres horloges rétiniennes et s'il contribue à la synchronisation de l'ensemble du réseau. On analysera le fonctionnement de l'horloge rétinienne par bioluminescence *in vitro* couplée à de la pharmacologie ciblant les transporteurs du glutamate, présents sur les CGM et/ou les neurones. Pour comprendre si le glutamate a un rôle dans l'altération de la réponse visuelle jour/nuit on injectera par voie intravitréenne des inhibiteurs spécifiques des transporteurs du glutamate avant les électrorétinogrammes. Le projet est basé sur l'utilisation de souris génétiquement modifiées, un modèle de choix, actuellement, pour mesurer l'importance des horloges dans la physiologie.

Remplacer : Le modèle animal ne peut être remplacé, en ce qui concerne un tissu et une fonction qui sont aussi complexes que la rétine et la vision, par des systèmes *in vitro*.

Raffiner : Les analyses fonctionnelles impliquant des électrorétinogrammes ou enregistrements de l'activité électrique des cellules de la rétine seront réalisés sur animaux anesthésiés limitant le stress lié à la procédure. Les animaux seront hébergés en cages collectives contenant du matériel de nidation et un bâton à ronger. L'ensemble de ces éléments et les contraintes des analyses statistiques appropriées pour ce genre d'études conduiront à l'utilisation d'un nombre maximal de 160 animaux.

14033 L'amélioration des performances de croissance en production avicole s'est effectuée grâce à la sélection génétique et à une optimisation de l'alimentation, mais elle a été réalisée au détriment de la santé des animaux associée à une augmentation de l'incidence des maladies infectieuses. La coccidiose, causée par des parasites du genre *Eimeria*, représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture induisant des pertes de production ayant de graves conséquences économiques dues à de la mortalité mais surtout de la morbidité. L'infection par *Eimeria* conduit à une inflammation intestinale importante. Cependant, la nature des différents acteurs cellulaires et moléculaires ainsi que les mécanismes précis conduisant à cette inflammation nécessitent d'être mieux connus. Des travaux montrent l'importance de l'interleukine 17 (IL-17) sur l'inflammation et l'apparition de lésions. Dans ce contexte, et comme les lymphocytes T gamma delta sont des cellules majeures impliquées dans la production d'IL-17, nous avons pour objectif d'étudier le rôle fonctionnel de ces cellules dans la physiopathologie de l'infection par *Eimeria*. Nous testerons plusieurs espèces d'*Eimeria* indépendamment.

Pour ce faire nous utiliserons au maximum 700 poulets au total.

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

Remplacement : le rôle des lymphocytes T gamma delta dans la physiopathologie de l'infection par *Eimeria*, nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut être réalisée *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation.

Raffinement : Les poulets seront hébergés en cages adaptés à leur taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et eau à volonté et disposeront d'un enrichissement social et comportemental (pellet de fourrage compressé permettant aux animaux d'exprimer leur comportement de grattage piquage, petites plaques en inox suspendues ce qui permet aux animaux de piquer dedans).

14034 L'insulinorésistance (IR) se définit comme une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, qui a pour conséquence une incapacité de l'insuline à réguler les métabolismes glucidique et lipidique. Les principales caractéristiques de l'IR sont des défauts d'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux et de la néoglucogenèse hépatique ainsi qu'un défaut de transport du glucose dans le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Les mécanismes à l'origine de l'IR sont mal

connus, mais l'hypothèse principale implique un phénomène de lipotoxicité induit par des accumulations ectopiques de lipides. Ces désordres métaboliques sont associés à une réponse inflammatoire chronique dans les tissus adipeux caractérisée par une production anormale d'adipokines et de l'activation de divers processus pro-inflammatoires. De la même façon, la présence d'une IR hépatique, associée à un processus inflammatoire, conduit au développement de NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases, maladies hépatiques non alcooliques). Ainsi, processus inflammatoires, IR, obésité, diabète de type 2 et NAFLD sont intimement liés.

La forte prévalence des NAFLD n'a fait qu'accentuer l'intérêt porté à cette pathologie ces dernières années. Ainsi différentes méthodes d'imagerie de la pathologie se sont développées afin notamment d'identifier son stade de développement. Toutefois si le diagnostic de la fibrose ou de la stéatose est aujourd'hui réalisable grâce à différentes modalités, le suivi de l'inflammation hépatique de manière non invasive est aujourd'hui impossible. L'inflammation étant au cœur des mécanismes de développement des NAFLD, et ce dès ses stades les plus précoces, il semble pourtant primordial d'être capable de l'évaluer.

Nous nous proposons donc d'évaluer un nouvel agent d'imagerie spécifique de l'inflammation. Cet agent d'imagerie nucléaire fait actuellement l'objet d'un transfert en clinique mais pour une indication autre que l'inflammation hépatique, et nous souhaitons déterminer s'il pourrait également avoir un intérêt pour l'imagerie de l'inflammation dans les NAFLD.

Lors d'une précédente étude conduite chez la souris, la preuve de concept de la faisabilité de l'imagerie du foie avec cet agent d'imagerie a été réalisée en utilisant un modèle d'inflammation hépatique aiguë, induite par un régime alimentaire MCD carencé en deux acides aminés (la Méthionine et la Choline). Cette étude a permis de démontrer que l'agent d'imagerie permet effectivement de visualiser et de quantifier de manière non invasive l'inflammation hépatique. Suite à cette preuve de concept, nous souhaitons poursuivre l'évaluation sur des modèles murins beaucoup plus proches, en termes de physiopathologie des NAFLD, de celle observée en pratique clinique. Ainsi nous avons étudié avec succès l'inflammation hépatique de souris nourries avec un régime enrichi en lipides et en fructose (régime DIN). L'intérêt d'étudier de tel modèle est double. Premièrement, ces modèles étant proches de la clinique, les données obtenues chez la souris seront plus prédictives de ce qui pourrait être observé chez l'homme. Deuxièmement, ils seraient également plus adaptés pour évaluer l'effet de thérapeutiques. La présente demande permettrait de réaliser l'imagerie de l'inflammation hépatique sur un nouveau modèle murin de NAFLD, déjà décrit dans la littérature, et ainsi d'affiner nos connaissances sur les mécanismes à l'origine de cette pathologie.

Au total 80 souris seront utilisées.

Tout au long des études *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Les régimes alimentaires entraîneront une prise de poids, mais pas de phénotype dommageable. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections du radiotracer selon les bonnes pratiques vétérinaires.

14035 La lutte contre les dommages cérébraux constitue un véritable enjeu de santé publique (accidents vasculaires cérébraux, traumatismes cérébraux, lésions cérébrales, maladies neurodégénératives...). Les séquelles liées à ces pathologies sont nombreuses et peuvent impacter plusieurs fonctions cérébrales telles que la cognition, la parole, la motricité ou encore la mémoire.

Malheureusement, les traitements pour ces différentes pathologies (ex : accidents vasculaires cérébraux et lésions cérébrales) sont pour le moment manquants ou relativement inefficaces. Ainsi, les conséquences peuvent être la mort du patient ou le développement de séquelles permanentes (paralysie, aphasie, perte de sensibilité nerveuse etc...).

En plus d'études *in vitro*, des études récentes effectuées chez la souris semblent montrer un effet protecteur des lipoprotéines de haute densité (HDL) sur la physiologie cérébrale et le score

neurologique à la suite d'une ischémie cérébrale. Cette donnée laisse espérer que les HDL pourraient également avoir des propriétés intéressantes dans d'autres troubles du système nerveux comme des lésions cérébrales.

Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer l'effet de l'injection des HDL sur des modèles de lésion cérébrales effectuées chez un organisme modèle, le poisson zèbre. Nous nous intéresserons entre autres à l'effet des HDL sur:

- 1) l'activité neurogénique.
- 2) la réparation cérébrale.
- 3) la physiologie barrière hémato-encéphalique (BHE).

En parallèle, nous consoliderons des données préliminaires sur la biodistribution des HDL en utilisant les modèles poisson zèbre et souris.

Ces expérimentations seront menées sur un nombre total maximum de 204 poissons zèbre. Parmi ces poissons :

- 60 poissons seront utilisés pour étudier l'effet d'une injection contrôle (3x10) et de HDL (3x10) sur les mécanismes précédemment cités (activité neurogénique/BHE). Les répétitions n=3 permettent de donner de la puissance statistique sur des manips indépendantes.

- 120 poissons seront utilisés pour étudier l'effet d'une injection contrôle (3x20) et de HDL (3x20) sur les mécanismes précédemment cités dans des conditions de lésions cérébrales (réparation cérébrale/BHE). Les répétitions n=3 permettent de donner de la puissance statistique sur des manips indépendantes.

- 6 animaux injectés avec des HDL marquées au technétium pour étudier la biodistribution des HDL (condition homéostatique (n=3) ou de lésion cérébrale (n=3)) via le PET/Scan versus 6 animaux injectés au PBS (condition homéostatique (n=3) ou de lésion cérébrale (n=3))

- 6 animaux injectés avec des HDL fluorescentes pour étudier la biodistribution des HDL (condition homéostatique

(n=3) ou de lésion cérébrale (n=3)) versus 6 animaux injectés au PBS (condition homéostatique (n=3) ou de lésion cérébrale (n=3))

En parallèle, nous utiliserons

- 18 souris mâles ou femelles C57BL6 injectées avec du PBS (n=6) ou des HDL (n=12, fluorescentes (n=6) ou marquées au technétium (n=6)) pour étudier la biodistribution des HDL et la comparer à celle de notre modèle poisson.

De part des mécanismes physiologiques fortement conservés au cours de l'évolution, le poisson zèbre présente l'avantage d'être un modèle simplifié pour la modélisation de maladies humaines, ainsi que pour la découverte et le développement de composés pharmaceutiques. Aujourd'hui, le poisson zèbre est reconnu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme. C'est aussi un excellent modèle pour comprendre les mécanismes de réparation cérébrale.

Cette étude qui répond à la règle des 3R :

Remplacement : des études *in vitro* ont déjà été menées montrant les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes des HDL. Il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les effets des HDL sur des paramètres physiologiques cérébraux, notamment sur les mécanismes de plasticité et de réparation.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques solides (student t-test et ANOVA). Si les résultats obtenus au cours des expérimentations permettent de réduire le nombre d'animaux, le nombre total de 222 ne sera pas atteint pour les poissons (204) ainsi que chez la souris (18).

Raffinement : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28,5°C ; oxygénation ; enrichissement (rotifères)). Les animaux seront nourris plusieurs fois par jour, et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale. Il en sera de même pour les souris qui seront maintenues dans des salles d'hébergement contrôlées

sur divers facteurs d'ambiance (hygrométrie, température, alternance jour/nuit). Leur environnement sera enrichi afin de limiter leur stress et anxiété (abris en polycarbonate de couleur rouge leur offrant un abri obscur et permettant leur surveillance, musique).

14036 En 2004, le nombre de personnes touchées par la pathologie d'Alzheimer était de 25 millions. Du fait de l'accroissement de la durée de la vie, on estime que le seuil des 65 millions de malades sera atteint en 2030.

Les études portant sur le développement de la maladie d'Alzheimer impliquent la caractérisation du fonctionnement du système nerveux central, ce qui nécessite de mener des études chez l'animal à différents âges. Les analyses comportementales privilégient les domaines de l'apprentissage et de la mémoire, évalués chez les rongeurs au moyen de deux tests éthologiques de référence : le labyrinthe en Y et la piscine aquatique de Morris. Cependant, ce dernier test engendre des complications dues à ses modalités d'application. En effet, même si dans cette procédure l'apprentissage spatial est bien caractérisé, le stress situationnel induit par le placement de l'animal dans l'eau ainsi que la fatigue cumulée essai après essai sont des facteurs délétères, à la fois pour l'animal et pour l'interprétation des résultats expérimentaux, surtout chez des animaux âgés ou en surpoids, dont les capacités physiques peuvent être inadaptées à ces contraintes.

En conséquence, nous souhaitons valider un test alternatif à la piscine de Morris, évaluant identiquement la mémoire spatiale, mais dont les modalités d'utilisation seraient beaucoup moins stressantes pour les animaux. Notre choix s'est porté sur test de Barnes, dispositif constitué par un disque circulaire d'un mètre de diamètre, placé en hauteur, et percé de 44 trous. Cet espace ouvert, par nature aversif aux souris, comporte une chambre d'échappement située sous le plateau, accessible via une seule des ouvertures, dont l'animal apprend la localisation grâce à des indices spatiaux. Lors des évaluations de la mémoire spatiale, l'utilisation de ce dispositif permettra d'éviter à la fois le stress situationnel et la forte sollicitation des capacités locomotrices des animaux. Ainsi, plus éthique que la procédure de Morris, ce test de Barnes devrait être également plus sensible dans la détection des atteintes des fonctions de l'apprentissage et de la mémoire.

Ce projet porte sur la validation expérimentale de ce dispositif, dans l'objectif de nous affranchir de l'utilisation du labyrinthe aquatique de Morris.

Plusieurs groupes de souris seront nécessaires à cette étude, en particulier un groupe présentant les symptômes de la maladie d'Alzheimer, ainsi qu'un groupe soumis à une molécule à effet amnésiant. Les performances comportementales de ces animaux à l'issue de leur évaluation dans le test de Barnes seront comparées à celles de souris témoins et nous permettront de valider ou non l'utilisation d'un tel dispositif en remplacement du test de la piscine de Morris.

Les animaux seront stabulés à 4 par cage ; les cages comprendront des éléments d'enrichissement du milieu sous la forme de papier carré végétal et de briquettes de bois. Une fois l'expérimentation terminée, les animaux seront mis à mort, puis différents organes seront prélevés et serviront à la mise au point de méthodes biochimiques *in vitro* sans lien direct avec ce projet (Réduction).

Ce type d'étude ne peut être réalisé que sur des animaux vivants, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les effets délétères ou bénéfiques de la nutrition et/ou de l'âge sur les fonctions cognitives, en particulier dans les domaines de l'apprentissage et de la mémoire (Remplacer).

L'étude sera réalisée sur 72 souris. L'effectif de 12 animaux par groupe a été fixé au minimum possible, tenant compte de la nécessité d'obtenir des données comportementales statistiquement exploitables en termes de puissance statistique (Réduire). Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffiner).

En cas de dépassement de l'un des points limites définis (signes physiologiques et comportementaux traduisant un état de douleur ou de détresse), les animaux seront mis à mort par une surdose d'anesthésique, leur décès sera vérifié par absence de battements cardiaques.

14037 La greffe rénale est le traitement de référence de l'insuffisance rénale terminale. Les inhibiteurs de la calcineurine permettent de prévenir efficacement le risque de rejet aigu précoce néanmoins après

quelques années survient une dysfonction chronique du greffon secondaire d'une part à la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine et d'autre part à un mauvais contrôle de la réponse allo-immune (humorale avec l'apparition d'anticorps anti-donneur et cellulaire matérialisée par une inflammation des plages de fibrose). La fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire (FIAT) en elle-même participe également grandement à la dysfonction chronique du greffon. Ainsi l'amélioration de la survie des greffons nécessite le développement de nouvelles stratégies immunosuppressives contrôlant mieux la réponse allo-immune et la progression de la fibrose. Dans cette optique les inhibiteurs de MEK sont une piste encourageante.

Les mutations de la voie RAS – RAF – MEK1/2 – ERK1/2 ou (mitogen-activated-protein-kinase (MAPKs) classique) sont parmi les plus rencontrées dans de très nombreux cancer. Ainsi des inhibiteurs de MEK ont été développés, dont le trametinib, qui depuis 2013 a une autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement du mélanome.

La voie MAPK classique étant située en aval du TCR (T Cell Receptor), les anti-MEK ont un effet immunosuppresseur. Dans le cadre de la transplantation celui-ci a été rapporté dans un modèle murin de Graft versus Host Disease, dans un modèle murin de greffe cardiaque et dans un modèle de transplantation pulmonaire chez le rat. Dans ces différents modèles les anti-MEK s'opposent à l'activation des CD8 et favorisent l'exhaustion des lymphocytes CD4 allo-réactifs. Par ailleurs les anti-MEK favorisent l'essor des lymphocytes T régulateurs. Enfin il a été montré dans des modèles murins que les anti-MEK permettent de prévenir la fibrose rénale.

Ces molécules ayant de plus un très bon profil de tolérance, elles apparaissent comme une bonne alternative aux anti-rejets conventionnels. C'est pourquoi nous souhaitons étudier l'effet d'un inhibiteur de MEK sur la prévention du rejet de greffe de peau humaine chez la souris NSG (Nod Scid Gamma) humanisée. Dans un premier temps nous étudierons l'effet de l'anti-MEK sur l'humanisation (105 souris). Dans un second temps nous étudierons l'effet des anti-MEK sur la greffe de peau (72 souris).

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

- Remplacer : la molécule que nous souhaitons tester chez la souris NSG humanisée a déjà été étudié *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins. Le passage dans un modèle *in vivo* mimant la situation complexe que constitue le système immunitaire humain apportera des arguments supplémentaires quant à son efficacité pour prévenir le rejet de greffe chez l'homme.

- Réduire : Les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est-à-dire validées avec tests statistiques). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ($n < 30$. Nombre total d'animaux 177).

- Raffiner : Lors des manipulations pouvant générer une douleur les animaux bénéficieront en amont d'une analgésie adaptée. Les souris seront hébergées sur des portoirs ventilés, avec un enrichissement adapté. Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque les cellules humaines seront injectées et les signes cliniques notables et sévères décrits dans le tableau en annexe de cette saisine seront notés. Lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux l'effet de la molécule testée.

14038 Les cellules immunitaires Natural Killer (NK) appartiennent à la première ligne de défense du corps contre les agents pathogènes. En effet, ces cellules sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées par un virus mais également les cellules cancéreuses. Cependant, en cas de sur-stimulation, les cellules NK vont devenir tolérantes et ne pourront plus exercer leur fonction. Cette situation explique que de nombreuses tumeurs échappent au contrôle exercé par les cellules NK. Restaurer la fonction des NK et ainsi leur contrôle sur la tumeur, est donc un objectif de portée thérapeutique et constitue le but de notre projet. Il existe chez la souris un modèle de tumeurs permettant d'induire l'épuisement des cellules NK. Cette perte de fonction est accompagnée de l'expression de certains récepteurs suppresseurs apparaissant suite à la sur-stimulation par les

cellules tumorales à la fois en contexte de tumeurs solides ou hématologiques chez la souris. Notre objectif ici vise à caractériser le rôle des NK dans l'élimination de ces deux types de tumeurs c'est à dire de déterminer les moyens utilisés par les NK pour tuer les cellules cancéreuses et les métastases associées afin de proposer des thérapies ciblées par la suite. Les souris seront injectées avec différentes cellules tumorales engendrant ou non le processus d'épuisement puis la localisation de la tumeur et des métastases associées sera suivie par imagerie *in vivo*. Ensuite, l'élimination des cellules tumorales sera suivie après injection dans trois souches de souris mutantes pour certains gènes importants pour la fonction des NK afin de déterminer les voies utilisées par les NK pour éliminer ces cellules. Ce type de projet nécessite l'utilisation de modèles animaux, le nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu étant trop nombreux et leurs interactions trop complexes pour pouvoir être modélisés *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (738), des techniques de pointe permettant la mesure précise de différents paramètres dans les cellules seront utilisées telles que la cytométrie en flux multiparamétrique, la cytométrie d'image). Afin de réduire le nombre d'animaux suivis nous utiliserons également l'imagerie *in vivo* qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (car les mêmes souris peuvent être suivies au cours du temps). Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Nous avons défini des points limite au delà desquels les animaux seront mis à mort.

14039 La cécité nocturne congénitale stationnaire (CNCS) est un groupe de pathologies rétiniennes cliniquement et génétiquement hétérogène. La plupart des personnes atteintes ont une acuité visuelle basse, associée à des difficultés d'orientation en condition de faible luminosité. De nombreux patients présentent également d'autres anomalies oculaires telles qu'une forte myopie (< -6 dioptries), un strabisme ou un nystagmus. Parmi les différentes formes de CNCS, la forme complète, CNCS_c, se caractérise par un dysfonctionnement de la transmission du signal entre les photorécepteurs et une classe de cellules bipolaires. Ce mécanisme n'est actuellement toujours pas bien compris.

Dans ses études, l'équipe a identifié des mutations dans différents gènes associés à la CNCS_c. Dans ce projet, nous proposons d'élucider le rôle de MKP-2/DUSP4, une protéine sous-régulée dans plusieurs souris qui ont une CNCS_c. L'analyse fonctionnelle *in vivo* et *ex vivo* permettra de valider le phénotype de des animaux portant la mutation dans le gène *Mkp-2/Dusp4*. Au total, 90 souris seront nécessaires à cette étude.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », 1) remplacement : Etant donné qu'il n'est possible de reproduire un modèle de cécité nocturne *in vitro*, nos études nécessitent l'utilisation d'un modèle animal.

2) réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre objectif scientifique du projet. 3) raffinement : Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

14040 La maladie rénale chronique (MRC) est un processus pathologique altérant de manière progressive et irréversible la fonction rénale et qui aboutit à l'installation progressive de la fibrose du rein. La MRC touche plus de 2,5 millions de personnes en France et le taux de personnes atteintes augmente de 7 à 8% par an. De nos jours, il n'existe pas de traitement efficace et les seuls recours, afin de prolonger la vie des patients qui sont arrivés au stade terminal de la maladie, sont la dialyse ou la transplantation rénale.

Nous avons précédemment démontré que l'expression de la Connexine 43 (Cx43), protéine constitutive des jonctions intercellulaires communicantes, ou jonctions de type gap, était

anormalement élevée lors de la progression de l'IRC. Cette augmentation s'est avérée délétère car son inhibition permet de protéger les souris de différents types de néphropathies expérimentales, qui mimet donc la maladie rénale chez l'homme. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'identifier les mécanismes moléculaires qui favorisent la progression de la MRC en relation avec l'augmentation pathologique de la Cx43. Pour cela, nous souhaitons créer de nouvelles lignées de souris transgéniques chez lesquelles nous pourrions diminuer de manière ciblée l'expression de cette protéine dans de types cellulaires bien définis.

Nous avons au préalable effectué de nombreux tests *in vitro* afin de valider la pertinence dans des types cellulaires choisis ainsi que celle de la protéine d'intérêt. Ces travaux nous ont permis de réduire le nombre estimé d'animaux pour ce projet dans les 5 années à venir à 1645 souris, afin de respecter la règle des 3R. L'intérêt de ce projet est 1/ d'étudier l'impact de la délétion ciblée de la Cx43 dans développement de différents types de néphropathie, et 2/ de caractériser les mécanismes moléculaires via lesquels cette protéine médie ses effets délétères lors de la progression de la maladie rénale.

Pour étudier les différentes étapes de la maladie rénale chronique telles que les lésions vasculaires, inflammatoires et fibrosantes, les expériences ne peuvent être réalisées *in vitro*. En effet, le rein est constitué de plusieurs compartiments types cellulaires qui peuvent agir en synergie lors de la progression de maladies rénales. Cela étant dit, nous effectuons la plupart des expériences de signalisation sur des cultures primaires ou de lignées de cellules rénales en complément des protocoles animaux.

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

Enfin, la création de ces nouveaux modèles murins apportera des nouvelles connaissances dans la biologie de jonctions gap et permettra de faire un pas supplémentaire vers le développement de stratégies thérapeutiques ciblant tout particulièrement la Cx43 lors de la progression de la MRC.

14041 Le rumen est un compartiment digestif comportant un important écosystème microbien qui donne aux ruminants une capacité remarquable de digérer les fibres végétales et d'en retirer une grande partie de leurs nutriments. Cet écosystème est dépendant des conditions physiques du milieu, et notamment du pH qui peut modifier les équilibres des populations et les métabolismes microbiens. Les réactions métaboliques microbiennes ont aussi pour effet de modifier les conditions de milieu. Chez les vaches laitières, une maladie métabolique commune est l'acidose ruminale qui consiste en un dérèglement des conditions fermentaires dans le rumen et en particulier en une baisse du pH suite à une production d'acide lactique. Les conséquences pour l'animal sont, à court terme, des baisses d'ingestion plus ou moins régulières et à long terme, une perturbation du fonctionnement du rumen, voire même des lésions sous forme de kératinisation de la paroi ruminale. Le risque d'acidose est réputé commun en élevage car les besoins nutritionnels des vaches laitières peuvent être difficiles à couvrir en début de lactation sans avoir recours à des concentrés susceptibles de fermenter rapidement dans le rumen. Pour cette raison, des suppléments peuvent être proposés aux éleveurs pour limiter les risques d'acidose. Parmi eux, le bicarbonate de sodium est un classique mais des suppléments issus de carbonates marins peuvent aussi être une solution.

Un premier objectif du projet est de comparer l'effet de 2 suppléments consistant pour le premier en du bicarbonate de sodium et pour le second en un carbonate marin, à un témoin sans supplément, sur les dynamiques journalières de pH ruminal. Le second objectif sera de déterminer si un système de mesure du pH ruminal téléométrique peut se substituer au recours de vaches laitières équipées de sondes de pH filaire. Pour cet essai, 6 vaches laitières en lactation seront mobilisées pendant 3 mois. Des mesures de pH ruminal seront réalisés en parallèle avec des sondes de pH filaires, des sondes de pH téléométrique et des prélèvements de jus de rumen.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour définir si la ration alimentaire est susceptible de modifier le pH du rumen car ce dernier résulte de l'équilibre entre l'absorption des acides gras volatils par la paroi ruminale et leur production par les fermentations.

Réduire : Le nombre d'animaux impliqué est réduit à 6 car le recours à un carré latin, qui consiste en une succession de trois périodes pendant lesquelles chaque vache recevra un type de supplément, permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux.

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe d'acidose et les traiter. Par ailleurs, cet essai a pour objectif de raffiner la mesure du pH ruminal dans de futurs essais.

14042 L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est un cancer diagnostiqué tardivement et de mauvais pronostic (<5% de survie à 5 ans). Seuls les patients présentant une tumeur bien localisée (10 à 20%) bénéficient d'une intervention chirurgicale. Leur sélection est difficile, l'imagerie anatomique ayant une efficacité limitée pour la détection de l'invasion locale et des petites métastases. Une technique d'imagerie fonctionnelle sensible et spécifique, telle que la tomographie à émission de positons (TEP), permettrait une meilleure délimitation du tissu pathologique. Chez les patients opérés, les résections incomplètes laissant en place un reliquat microscopique présentent un risque de récurrence supérieur à 80%. Ceci est dû en partie à la difficulté d'évaluer les marges tumorales en per-opératoire. La chirurgie du cancer guidée par fluorescence (FGS), est une technique récemment introduite en clinique. Associée à une sonde fluorescente spécifique, elle permet d'identifier avec plus de précision l'extension locale de la tumeur et de ses métastases, invisibles à l'œil nu.

L'objectif de ce projet collaboratif est de développer à partir d'un peptide, un ensemble de sondes d'imagerie bimodales (Fluorescente et TEP) ciblant le récepteur de la neurotensine et de démontrer leur intérêt chez le petit animal atteint de cancer du pancréas. L'intérêt pour le patient serait double : radioactive la sonde permettrait de diagnostiquer et dresser le bilan d'extension de la maladie en TEP et fluorescente elle faciliterait la détection de la tumeur et de ses métastases lors d'une chirurgie intra-opératoire.

Nous estimons qu'il faudra utiliser environ 50 souris pour répondre à l'ensemble de nos questions durant les 2 ans prévus du projet.

La règle des 3R a été envisagée lors de l'élaboration du projet. Le nombre d'animaux a été réduit, notamment par l'utilisation de l'imagerie non invasive pour suivre des modèles *in vivo* uniques parfaitement décrits dans la littérature (modèle de xénogreffe du cancer du pancréas en sous cutané)

Tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

14043 Les infections respiratoires représentent l'une des principales préoccupations médicales, en raison de leur capacité à se propager rapidement dans une population. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les infections respiratoires restent la maladie transmissible la plus meurtrière et la principale cause de mortalité dans les pays à faible revenu, ayant notamment causé 3 millions de décès dans le monde en 2016. Jusqu'à présent, la production de vaccins de longue durée contre certains pathogènes respiratoires, comme le virus de la grippe ou le pneumocoque, a été sans succès. Ce projet se concentrera sur la manière dont nos cellules immunitaires pulmonaires contrôlent la génération d'anticorps lors d'infections respiratoires virales et bactériennes. Une compréhension plus approfondie de ce procédé fournira des informations médicales essentielles pour le développement d'un vaccin antigrippal universel et pour la prévention de la pneumonie bactérienne. Mes objectifs spécifiques sont les suivants:

1) Comprendre comment l'immunité des cellules B se déclenche directement au niveau de la muqueuse pulmonaire lors d'une infection respiratoire virale.

2) Identifier les métabolites de la vitamine B, produits par les bactéries pathogènes respiratoires, comme une source potentielle d'antigène étranger pour renforcer l'immunité des cellules B.

Afin d'évaluer les réponses des cellules B dans la muqueuse pulmonaire lors d'une infection respiratoire *in vivo*, nous utiliserons des souris de type sauvage et transgéniques provenant d'établissements éleveurs, fournisseurs localisés et collaborateurs. La compréhension globale de l'induction de la réponse immunitaire mucoale anti-infectieuse ne peut s'envisager qu'au travers de l'analyse de l'organisme entier et l'utilisation du modèle animal murin est indispensable. A défaut de remplacer le modèle animal, nous suivrons la règle des 3R et réduirons son utilisation au strict minimum pour obtenir des résultats fiables:

- Réduction: dans la mesure du possible, nous limiterons le nombre d'animaux au minimum nécessaire. Nous utiliserons des tests statistiques pour planifier des expériences afin de nous assurer que le nombre minimum d'animaux est utilisé pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Chaque expérimentation sera répétée trois fois pour être statistiquement pertinente, complète et pour répondre aux exigences des jurneaux et de la communauté scientifique. L'utilisation de 2588 souris sera nécessaire pour finaliser l'ensemble du projet. De plus, nous effectuerons plusieurs analyses sur la même souris: nous effectuerons simultanément des analyses de cytométrie en flux multicolore, des tests ELISPOTS et une immunohistochimie pour déterminer l'ampleur des réponses des cellules B. Nous allons congeler les lignées transgéniques plutôt que de continuer à les garder en stocks.

- Raffinement: les souris seront élevées dans des animaleries conventionnelles et de niveau 2 exemptes d'organisme pathogène spécifique. La température, l'hygrométrie et la photopériode sont contrôlées et régulées. Un animal bénéficiera d'au moins 100 cm² de surface. Pour limiter le stress des animaux, ils disposent de matériel pour confectionner des nids et des dômes protecteurs. Nous utiliserons différentes procédures qui causent un minimum de détresse aux animaux. L'utilisation d'animaux génétiquement modifiés précédemment caractérisés est une bonne approche pour affiner les études sur les animaux, car elle évite l'utilisation de drogues destinées à bloquer un processus biologique pouvant avoir des conséquences imprévues. Seules les infections virales et bactériennes sur le long terme, engendreront une altération de l'état de santé des souris. L'utilisation d'anesthésiques, de doses sublétales de virus et de bactéries et la détection d'un point limite précoce limiteront autant que possible la souffrance des animaux. Ces infections sont toutefois indispensables à la compréhension des mécanismes de défense immunitaire mucoale de l'organisme et à l'établissement du rôle des cellules B dans ces mécanismes.

- Remplacement: La recherche sur les animaux est effectuée lorsqu'aucune autre approche n'apporte le bénéfice scientifique pertinent. Dans cette étude, nous analyserons l'acquisition de particules virales par les cellules B dans la muqueuse pulmonaire et les interactions potentielles entre les cellules B et les cellules MAIT lors d'une infection bactérienne. Ce projet nécessite la mesure de différents paramètres de la réponse immunitaire au cours d'infections. Ainsi l'intégration d'un système vivant et complet est indispensable. La physiopathologie de la souris est suffisamment proche de celle de l'homme pour que son étude nous permette d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme.

14044 La déficience en céramidase acide est un groupe de maladies autosomiques récessives. Elles affectent environ une personne sur un million. Elles sont dues à des mutations dans le gène *ASAH1* (N-acylsphingosine amidohydrolase-1). Les mutations dans ce gène sont à l'origine de la maladie de Farber et d'une forme rare d'amyotrophie spinale proximale avec épilepsie myoclonique progressive (AMS-EMP).

Les symptômes de l'AMS-EMP peuvent apparaître dès l'âge de 2 ans et incluent une difficulté croissante à marcher, des chutes régulières, une faiblesse musculaire et des tremblements. L'épilepsie se développe généralement à la fin de l'enfance. Au fur et à mesure que la maladie

progressive, les patients ont une activité épileptique croissante, une mobilité altérée, des dysfonctionnements cognitifs, une perte auditive ainsi qu'une atrophie cérébrale et cérébelleuse.

La maladie de Farber est, quant à elle, caractérisée par de douloureuses malformations articulaires, des nodules lipomateux sous-cutanés, un enrouement vocal. Cette maladie est souvent fatale entre 2 et 3 ans. La gravité de la maladie de Farber masque probablement l'atteinte du système nerveux central qui survient plus tardivement.

Le gène *ASAH1* code pour la céramidase acide (ou N-acylsphingosine amidohydrolase-1). C'est une enzyme lysosomale qui hydrolyse la céramide en sphingosine et acide gras.

Les patients atteints d'une AMS-EMP et de la maladie de Farber ont un déficit de l'activité enzymatique de la céramidase acide. Ce déficit est responsable de l'accumulation intracellulaire de céramide qui est toxique pour la cellule. Il n'existe actuellement aucun traitement pour ces deux pathologies. Le but ultime du projet est donc de concevoir une thérapie génique pour traiter la déficience en acide céramidase. Afin de réaliser des études précliniques, nous allons utiliser le modèle murin *Asah1 P361R/P361R* : ce modèle reproduit plusieurs symptômes observés dans les cas classiques de la maladie de Farber. Grâce à l'aide de vecteurs AAV (dérivés de virus associés à l'adénovirus), nous allons introduire le gène humain *ASAH1* dans le modèle murin *Asah1 P361R/P361R* à différents âges de la souris (J0, J21) par deux types de voie d'administration (intracérébroventriculaire et intraveineuse).

Pour tenir en compte le bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant la règle des 3 R :

Remplacement : il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude de cette pathologie, car bien que des modèles cellulaires déficients en céramidase acide existent, ils ne permettent pas d'étudier certains défauts fonctionnels majeurs de la pathologie. Le modèle murin utilisé ici présente une espérance de vie réduite avec manifestations des premiers symptômes à partir de 3 semaines. Il reproduit également certains symptômes de la maladie de Farber observés dans les cas classiques : à savoir une accumulation toxique de céramide dans les tissus qui conduit à un retard dans la croissance et une hépatosplénomégalie. Des infiltrations de macrophages ont été également décrites dans le foie, la rate, le thymus et le cortex. De plus, le taux élevé de céramide dans le cerveau cause une pathologie neuronale avec hydrocéphalie et dysplasie de la rétine. Nous pourrions donc suivre l'évolution de la maladie suite aux approches que nous souhaitons tester.

Réduction : certaines souris issues des croisements mais ne présentant pas de pathologie seront utilisées pour les croisements nécessaires au maintien de la lignée.

La déficience en céramidase acide affecte indifféremment les hommes et les femmes : des souris des deux sexes seront donc utilisées. Afin de limiter le nombre d'animaux, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 18 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test non paramétrique de comparaison des moyennes, voir annexe).

Raffinement pour les animaux injectés avec des vecteurs viraux. Au moment des injections, les expérimentateurs feront attention aux hémorragies éventuelles qui pourront survenir jusqu'à une heure post-injection. On ne peut pas exclure qu'une des doses testées induise des effets indésirables chez la souris. Pour cette raison des observations et des mesures de poids seront effectuées 2 fois par semaine. En cas de dégradation de l'état général de l'animal, des soins seront administrés (désinfection locale (vétédine) et pansement de plaies cutanées et oculaires si nécessaire (biafine)). La douleur générée par les injections intraveineuses est légère. La douleur générée par l'injection intracérébroventriculaire à la naissance sera prévenue par l'induction d'hypothermie. Il s'agit d'une forme d'anesthésie appropriée pour des petits animaux jusqu'à l'âge de 5 jours et quand ils subissent une procédure chirurgicale inférieure à 5 minutes. Ces expérimentations ne dépasseront pas le degré de douleur modéré. Pour les souris malades présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol de la cage afin de leur en faciliter l'accès.

Notre projet durera 4 ans et nécessitera l'utilisation totale de 918 souris.

14045 Le nombre de nouveaux cas de cancer diagnostiqués en 2017 en France métropolitaine est de 399 500 (214 000 hommes et 185 500 femmes). La prise en charge et la recherche de traitement des cancers est donc une mission majeure de santé publique. Depuis le début du siècle, des avancées scientifiques majeures ont contribué à démontrer le rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement du cancer.

Ainsi, les scientifiques responsables du développement de l'immunothérapie, et en particulier des Immune Checkpoint Blockade (ICB) (inhibiteurs de points de contrôle de l'immunité en français) ont été récompensés par le prix Nobel 2018. Ces traitements visent à renforcer l'activité anti-tumorale du système immunitaire.

De par leur efficacité avérée, ces traitements sont indiqués progressivement dans différents cancers. Cependant, seulement une minorité de patients (environ 20%) répondent significativement à ces traitements. Un concept émergent suggère que les dommages du matériel génétique des cellules cancéreuses peuvent façonner le système immunitaire afin d'améliorer le taux de réponse aux ICB. Ce projet se focalise ainsi sur les tumeurs Mismatch Repair Déficiantes (MMRD). Ces tumeurs ont un défaut de réparation des gènes lors de la division cellulaire et montrent une amélioration du taux de réponse aux ICB qui atteint 50%.

Ce projet vise à comprendre pourquoi ces tumeurs en particulier répondent mieux à l'immunothérapie. Ainsi, il permettrait de répondre à deux objectifs. Le premier est de cibler au mieux les tumeurs MMRD susceptibles de répondre à l'immunothérapie. Le deuxième objectif est de permettre à d'autres tumeurs, ayant des similitudes avec des tumeurs MMRD, de bénéficier de l'immunothérapie.

Afin de déterminer si ces modifications génétiques modulent la réponse aux ICB, ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, pour étudier des modifications du système immunitaire après un traitement systémique, l'expérimentation sur animal vivant immunocompétent reste indispensable puisqu'il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité (remplacement). L'expérimentation sera divisée en étapes clefs, afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaire en cas de non validation de l'étape précédente (go/no-go).

Il s'agit d'un projet sur 5 ans. Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. 640 souris seront nécessaires à sa mise en œuvre et ce nombre se justifie également par la diversité des modèles de tumeurs (2), d'agents anti-cancéreux (2), des voies de signalisation (10 constructions génétiques afin d'étudier 2 voies cellulaires) qui vont être étudiées ainsi que la durée du projet. De plus, beaucoup de paramètres immunologiques seront étudiés au cours d'une même procédure afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction).

Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux : hébergement en groupe dans des cages appropriées et enrichies, de taille adaptée au nombre d'individus, respect des points limites, anesthésie et analgésie (raffinement), examen clinique quotidiens et soins en cas d'inconfort ou de problème sanitaire.

14046 La rhabdomyolyse est une lyse des cellules musculaires striées entraînant le relargage du contenu de la cellule musculaire dans la circulation sanguine. Les causes de ce syndrome sont multiples mais dominées par le « crush syndrome » où le muscle est directement lésé, par exemple en cas de tremblement de terre conduisant à l'ensevelissement sous des décombres mais également en cas de station prolongée au sol, chez les personnes âgées chutant au domicile. La principale complication de ce syndrome est l'insuffisance rénale aiguë (IRA) qui peut mettre en jeu le pronostic vital car il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement spécifique. Cette atteinte n'est pas négligeable car elle représente jusqu'à 8% de l'ensemble des causes d'insuffisance rénale aiguë. La physiopathologie de ce syndrome est principalement liée à la libération de myoglobine, une protéine apparentée à l'hémoglobine, car elle contient, l'hème en tant que transporteur d'oxygène. Il a déjà été démontré, dans un contexte d'hémolyse intra-vasculaire, que l'hème est capable d'activer le système du complément (appartenant à l'immunité innée). De plus, cette activation peut

mettre en jeu le TLR4, le récepteur de l'hème. La rhabdomyolyse, via la libération de myoglobine, se complique également d'une surcharge en hème. C'est pourquoi, l'injection d'un capteur de l'hème représente une piste thérapeutique prometteuse.

Cependant, l'implication du complément dans cette pathologie reste méconnue bien que nous l'avons détecté chez des patients présentant une rhabdomyolyse dans les reins. Notre objectif serait de mettre en évidence que le système du complément pourrait jouer un rôle clef dans l'insuffisance rénale aiguë de la rhabdomyolyse via la libération d'hème.

Durant notre projet, nous étudierons l'implication du système du complément dans la rhabdomyolyse dans un modèle murin et nous testerons ces cibles thérapeutiques et leurs potentiels effets bénéfiques.

Les résultats de ce projet permettraient de mieux comprendre la physiopathologie de la rhabdomyolyse et d'ouvrir la voie vers des thérapeutiques spécifiques qui manquent cruellement à l'heure actuelle.

Pour répondre à tous les objectifs de ce projet nous aurons différentes procédures en mimant la rhabdomyolyse chez des souris contrôles et des souris génétiquement modifiées au niveau du système du complément. Ainsi nous pourrions comprendre quelles voies du complément interviendrait dans cette maladie. De plus, dans nos procédures nous injecterons des molécules à visées thérapeutiques dans nos différents modèles.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les règles de bien-être animal et la théorie des 3R seront respectées et se portera ainsi :

1) Refine (Raffinement) : Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie. Une attention particulière sera portée au raffinement de l'environnement des animaux. Leur nombre ne dépassera pas les 2 à 5 souris par cage, et l'environnement sera complété avec du matériel afin de créer un environnement non stressant pour l'animal (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Le raffinement de notre protocole expérimental par des approches non invasives pour suivre l'évolution de la pathologie par analyse d'urines permettra d'effectuer le suivi. De plus, des points limites ont été établis, pour définir à quel moment sacrifier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

2) Replace (Remplacement) : Pour ces expériences, les modèles expérimentaux *in vivo* (animaux) sont les seuls permettant d'évaluer l'impact de l'activation du complément à la surface d'un organe entier et sur la dégradation de sa fonction, impossible à réaliser un modèle *in vitro* (cellules). De plus, l'efficacité d'un traitement ne peut être évaluée que sur un organisme entier pour ne pas se restreindre à un effet observé dans un système cloisonné.

3) Reduce (Réduction) le nombre d'animaux en expérimentation : L'expérience acquise dans un autre modèle de surcharge en hème (hémolyse intra-vasculaire) et l'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude bibliographique permettent de réduire le nombre de souris utilisées. Nous utiliserons 10 souris car au cours d'expériences précédentes nous avons calculer que le nombre de souris minimum nécessaire est de 10 afin de répondre à une analyse statistique multi-paramétrique robuste. Chaque expérience sera réalisée 2 fois pour étudier l'atteinte rénale et l'activation du complément par des méthodes différentes non compatibles l'une avec l'autre (transcriptomique, imagerie et cytométrie en flux). Les procédures démarreront sur des souris âgées de 6 à 10 semaines.

Cependant, afin de valider notre hypothèse et de prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 1590.

14047 L'obésité est un problème majeur de santé publique avec une augmentation constante de sa prévalence. L'exposition quotidienne aux polluants environnementaux comme les perturbateurs endocriniens (PE) peut contribuer au développement de l'obésité et aux troubles métaboliques associés. Un sous-ensemble de ces PE a été nommé « obésogène » et sont alors des perturbateurs métaboliques. On y trouve par exemple les organoétains, les parabens, les phtalates, les biphényles polychlorés et autres classes de PE vu leur capacité à interférer avec le système endocrinien, y

compris celui qui régule le métabolisme du tissu adipeux blanc (TAB). Ces PE obésogènes sont des composés qui font partie des produits de consommation courante et des produits industriels auxquels les humains sont exposés par des voies multiples, notamment par ingestion, inhalation, injection, contact transdermique et transport transplacentaire.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) possède de nombreux avantages méthodologiques pour étudier les facteurs génétiques et/ou environnementaux pouvant induire des pathologies de l'espèce humaine. Son génome est entièrement séquencé et présente un fort pourcentage de gènes homologues avec celui de l'espèce humaine. Il est un excellent organisme modèle pour l'étude des maladies métaboliques humaines comme l'obésité car il possède un métabolisme lipidique organisé de façon similaire à celui de l'humain et tous les organes clés nécessaires au contrôle métabolique y sont présents. De plus, chez le poisson zèbre, comme chez les mammifères, l'excès d'énergie est stocké sous la forme de gouttelettes lipidiques dans des adipocytes blancs. Par ailleurs, divers outils d'imagerie *in vivo* sont applicables du fait de la transparence optique des embryons et des larves. Les larves de poisson zèbre offrent un système unique pour étudier la formation et l'expansion des adipocytes et de l'adiposité de l'organisme entier en temps réel chez un vertébré vivant par l'utilisation du « zebrafish obesogenic test » (ZOT). Cette méthode permet d'examiner les effets de la composition des aliments, de médicaments et de contaminants environnementaux, seuls ou en combinaison, sur la dynamique de la quantité du TAB chez la larve de poisson zèbre. Le ZOT permet ainsi d'évaluer l'effet potentiellement obésogène et anti-obésogène des molécules chimiques et pharmacologiques et d'en analyser le mécanisme d'action.

L'objectif principal du projet est d'effectuer la validation du ZOT afin de pouvoir engager sa certification réglementaire auprès de l'European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) et de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). En effet, les outils de test actuels, y compris les tests réglementaires *in vivo* sur les rongeurs, ne sont pas suffisants pour dépister facilement les effets d'un grand nombre de produits chimiques et de leurs mélanges. Le ZOT peut être considéré comme une étape intermédiaire, entre les tests *in vitro* et ceux appliqués chez les rongeurs, en fournissant des données pertinentes *in vivo* sur les effets indésirables et le mode d'action endocrinien des PE dans le contexte de l'obésité. Le recours à l'expérimentation animale ne sera effectué que dans la mesure où une autre alternative n'est pas réalisable (3R : Remplacement).

Les travaux engagés concernent l'étude de la reproductibilité et de la fiabilité du ZOT. D'un point de vue expérimental notre projet consiste à tester les effets de différents PE à l'aide du ZOT sur des larves âgées de 6 à 8 semaines et d'une longueur comprise entre 8 et 9 mm. Le projet, d'une durée de 4 ans, inclut au maximum 12 082 larves sur l'ensemble du projet : 3 150 larves pour l'étude de toxicité permettant de déterminer les concentrations utilisées lors des expériences de ZOT ; 4 400 larves pour la validation du ZOT et l'évaluation de l'effet sur l'adiposité des molécules présumées obésogènes ; 792 larves pour la détermination de l'effet des PE sur la locomotion de la larve et par conséquent sur leur dépense énergétique et 3 740 larves pour les tests de chimie analytique et les analyses moléculaires afin de déterminer la ou les voie(s) de signalisation impactées suite à l'exposition aux PE obésogènes. Dans nos procédures, le respect de la règle des 3R est mis en œuvre par la réduction du nombre d'animaux utilisés pour les tests locomoteurs et d'obésité du fait du suivi individuel de l'animal. Ceci engendre un grand nombre de données individuelles permettant de limiter le nombre de réplifications des expérimentations grâce à une statistique utilisant l'appariement des données. Egalement, les animaux contrôles seront conservés si possible afin d'augmenter le nombre d'animaux reproducteurs au sein de notre animalerie agréée. (3R : Réduction). Les procédures expérimentales mises en œuvre s'effectueront au plus proche des conditions physiologiques de vie de l'animal avec des enceintes et eau chauffées à 28°C. A la fin de l'expérimentation, les larves exposées aux PE et ayant été enrôlées dans les tests de toxicité ou d'obésité seront euthanasiées par sédation profonde puis congélation. Seules les analyses chimiques et moléculaires seront réalisées sur des animaux après congélation instantanée dans l'azote liquide (-195°C). Les études seront conduites dans le respect des normes les plus strictes en matière de soins des animaux et d'évaluation de la souffrance animale. Les animaux seront maintenus dans des installations modernes et agréées pour assurer un confort maximal aux

animaux. Tout le personnel impliqué dans le travail des animaux doit avoir suivi une formation conformément aux réglementations institutionnelles et aux lois nationales relatives à la protection des droits des animaux (3R : Raffinement).

14048 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies neuromusculaires chez l'enfant. Elle est due à des mutations dans le gène de la dystrophine, une protéine jouant un rôle majeur dans la fonction et l'intégrité de la fibre musculaire. Elle est caractérisée par des atteintes musculaires progressives et graves qui entraînent une perte de la marche généralement entre 10 et 13 ans et la nécessité d'une assistance respiratoire à partir de l'adolescence. L'atteinte du muscle cardiaque met également en jeu le pronostic vital. A ce jour, il n'existe pas de thérapie pour la DMD.

La protéine dystrophine est une protéine trop grande pour être remplacée dans son intégralité. Pour contourner ce problème, des équipes de recherche ont créé des micro-dystrophines, plus courtes mais fonctionnelles. Des études utilisant la micro-dystrophine préalablement introduite dans un vecteur viral (AAV) dans les modèles murin et canin de la DMD ont montré une restauration efficace de la protéine. Aujourd'hui des essais cliniques utilisant l'AAV micro-dystrophine sont en cours.

Cependant, des études ont montré une perte progressive des génomes viraux dans les muscles dystrophiques, associée à une perte du bénéfice thérapeutique. De plus, l'injection d'AAV induit une réponse immunitaire qui empêche toute réinjection ultérieure. Alors que les essais cliniques pour les patients DMD sont en cours, il apparaît crucial de déterminer les conditions optimales d'administration de l'AAV micro-dystrophine afin d'obtenir une efficacité maximale et pérenne dans le temps.

Le but de ce projet est de trouver des solutions pour empêcher la perte des génomes viraux. Nous étudierons le rôle protecteur d'un prétraitement et/ou d'un post-traitement pharmacologique pour optimiser le maintien des génomes AAV micro-dystrophine dans les muscles de souris dystrophiques double knock-out dystrophine-utrophine (dko). Le pré-traitement pharmacologique des animaux devrait permettre la stabilisation transitoire des fibres au moment de l'injection de l'AAV et le post-traitement, un meilleur maintien des AAV dans le temps. L'objectif final étant le maintien durable du bénéfice thérapeutique induit par l'AAV micro-dystrophine.

Ce projet qui a pour but l'optimisation de l'approche thérapeutique AAV micro-dystrophine ne peut se faire que sur animaux et la souris est l'espèce de choix car la souris déficiente en dystrophine est le plus petit des modèles animaux mammifères de la myopathie de Duchenne. Néanmoins, afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique.

Le nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet est de 77 souris dko et 12 souris C57BL/6J.

Pour limiter la souffrance et l'angoisse, les injections IV en rétro-orbitale seront réalisées sous anesthésie gazeuse (l'isoflurane 3% en induction et 1.5% en maintien). Les souris seront ensuite conservées entre 3 et 24 semaines.

Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage.

14049 La technique de stéréotaxie est en pleine expansion du fait du développement de nouvelles méthodes permettant de moduler l'activité d'une population spécifique de neurones afin d'en comprendre le rôle dans le fonctionnement de circuits spécifiques du cerveau. Ces nouvelles méthodes requièrent une technique de haute précision et une excellente fiabilité. La technique de chirurgie stéréotaxique répond à cette demande de haute précision, pour injecter de très faible volume de solution dans une cible cérébrale, à condition d'être pratiquée par un expérimentateur

parfaitement formé aux méthodes et règles de stéréotaxie. Ces conditions sont garantes d'une bonne pratique dans le respect de l'animal et des meilleurs taux de réussite possibles pour ce type d'opération.

Cette demande d'autorisation d'expérimenter concerne un stage de formation à la neurochirurgie stéréotaxique - à raison d'un stage par an - chez les espèces les plus utilisées dans la recherche en neurosciences, à savoir le Rat et la Souris. Il s'adresse aux techniciens, ingénieurs et chercheurs avec une formation spécifique destinée aux personnes concevant ou appliquant des procédures expérimentales chirurgicales qui souhaitent apprendre ou se perfectionner dans cette technique de pointe de la neurochirurgie. Les objectifs sont de permettre sur une période d'une semaine l'acquisition des connaissances théoriques et pratiques nécessaires à la réalisation d'une neurochirurgie par stéréotaxie selon l'état de l'art et les bonnes pratiques de laboratoire. Le stage allie cours magistraux et travaux dirigés d'une part, et démonstrations et travaux pratiques d'autre part. Les cours magistraux et travaux dirigés (qui n'impliquent pas d'animaux) apportent les connaissances nécessaires à la mise en oeuvre des soins opératoires et péri-opératoires dans un projet impliquant la stéréotaxie (monitoring du bien-être de l'animal, anesthésie, prophylaxie et organisation du protocole dans le respect des besoins de l'animal), mais aussi les bases de neuroanatomie fonctionnelle, les principes de la stéréotaxie, la méthode de calcul des coordonnées pour une optimisation du geste et une ouverture sur les applications les plus récentes de la stéréotaxie. La partie consacrée à la pratique permet au stagiaire: 1) d'apprendre à identifier les moindres signes d'un possible mal être de l'animal pour y remédier dans les plus brefs délais et 2) d'appréhender en condition réelle chacun des gestes qui permettront d'assurer la réussite de son opération dans les meilleures conditions pour l'animal. Pour atteindre cet objectif, le stage se dote d'un fort taux d'encadrement de ces travaux pratiques (maximum de 2 stagiaires par formateur) qui permet un guidage personnalisé pour chacune des étapes de l'opération et pour surmonter efficacement toute difficulté éventuelle. Les formateurs ont au minimum une dizaine d'années d'expérience intensive de la pratique de la stéréotaxie.

Le nombre d'animaux (un maximum de 110 animaux pour 5 ans) est réduit au maximum grâce à l'introduction d'étapes de démonstration (2 animaux par an, 1 rat et 1 souris) et à l'attribution d'un seul animal par stagiaire pour une opération donnée. Les animaux utilisés dans ce stage seront préférentiellement des individus surnuméraires de nos élevages ou ceux n'ayant subi qu'une procédure légère dans un projet antérieur.

Remplacer: L'utilisation de vidéos d'enseignement permet de bien visualiser les étapes d'une opération stéréotaxique dans tous ses détails chez l'animal vivant, tandis que l'utilisation d'animaux artificiels permet d'acquérir et d'affiner l'aspect moteur des gestes d'une opération, mais aucune de ces méthodes ne permet 1) de combiner et améliorer les apprentissages visuels et moteurs inhérents à l'intervention, 2) de mettre l'expérimentateur en condition réelle pour faire face à la pression implicite de réussir à placer un animal vivant (anesthésié) dans un cadre stéréotaxique et à effectuer l'opération sans lui occasionner une quelconque souffrance, et 3) de retranscrire toute la finesse des signes physiologiques et comportementaux à repérer par la vision et le toucher pour identifier les signes de confort opératoire satisfaisant (tête bien fixée, corps en position détendue) ou les prémisses d'éveil, voire de mal être, chez l'animal. Enfin, la mise en présence avec les rongeurs permettra de détecter une éventuelle allergie.

Réduire: Les animaux utilisés dans ce stage sont préférentiellement des individus surnuméraires de nos élevages ou ceux n'ayant subi qu'une procédure légère dans un projet antérieur.

Raffiner: Les rats et les souris destinés au stage sont maintenus en groupe sociaux avec des éléments d'enrichissement dans leur cage et ils bénéficient d'un suivi de leur état comportemental et physiologique au quotidien. Seuls les formateurs procèdent à la manipulation des animaux éveillés et à leur anesthésie dans un environnement calme. Au cours des opérations, si malgré la couverture antalgique et le monitoring de l'état d'anesthésie, un animal donne le moindre signe de mal être, il sera mis à mort.

14050 Nous avons sélectionné durant une étude antérieure deux candidats médicamenteux avec des résultats très intéressants notamment la survie, dans cette saisine nous souhaitons étudier les mécanismes cellulaires de cette réponse à nos candidats.

Nous souhaitons évaluer le potentiel thérapeutique d'anticorps monoclonaux dans un modèle de greffe contre l'hôte (GVHD) xénogénique sur des souris NSG. Ce modèle sera induit par injection de cellules mononuclées de sang périphérique xénoréactives (PBMC).

Ces anticorps monoclonaux ciblent un récepteur membranaire exprimé sur les leucocytes humains. Il a été démontré que ce récepteur est un marqueur des lymphocytes T activés et aussi associé aux pathologies inflammatoires. Actuellement des anticorps ciblant ce récepteur sont utilisés en clinique pour la thérapie active sur le système immunitaire humain notamment en thérapie anti-cancéreuse. Cependant, des améliorations sont nécessaires.

Des nouveaux anticorps monoclonaux ont été générés et validés *in vitro* qui ont permis de sélectionner 2 candidats mais des tests *in vivo* sont nécessaires pour pouvoir envisager des essais cliniques nous devons tester ces anticorps dans des modèles *in vivo* dans les contextes d'une GVHD.

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

- Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immuno-régulatrice de la molécule dans un modèle *in vivo* proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 25, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 4 groupes (25 souris/groupe). Le groupe témoin recevra un isotype contrôle, les autres groupes seront traités avec des anticorps humains. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total des animaux est de 100.

- Raffiner : A partir de J0, les souris seront surveillées quotidiennement pour leur poids ainsi que le score clinique, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être (cf fichier annexe). Les conditions d'hébergement et d'enrichissement sont standards à l'espèce, les souris seront par groupe social de 5 maximum par cage ventilée sur un portoir à l'animalerie, avec des moyens d'enrichissement (des tunnels, et des bouts de papiers).

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le score clinique pour diagnostiquer le développement de la GVHD. Des prélèvements sanguins seront effectués une fois tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les molécules et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVHD, et par immuno-histologie pour étudier les conséquences de la migration des cellules injectées. Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des anticorps testés sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVHD et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées versus souris contrôles.

14051 Le botulisme aviaire est une pathologie due à l'action de la toxine botulique produite par *Clostridium botulinum* et ré-émergente au niveau mondial depuis une dizaine d'années en élevage et faune sauvage. Cette pathologie est encore méconnue et, de ce fait, délicate à gérer. Le botulisme aviaire est dû à la production *in situ* de la toxine botulique par le pathogène puis à la ré-ingestion de la toxine par l'animal via coprophagie.

Disposer d'un modèle infectieux de botulisme aviaire permettrait de mieux comprendre différentes questions relatives à cette maladie comme par exemple sa pathogénie et les mécanismes impliqués dans l'initiation et le développement de la maladie, d'identifier les organes et tissus contaminés par

le pathogène et le rôle de cette contamination des tissus par la bactérie dans la maladie ou bien encore d'explorer les aspects épidémiologiques (identification des sources de contamination, modalités de transmission entre individus) ;

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la reproduction expérimentale du botulisme aviaire (4 études dont 3 publiées dans les années 70). Sur la base des résultats présentés dans ces articles, l'objectif est de développer un modèle expérimental de botulisme aviaire et de déterminer les conditions expérimentales requises pour permettre la reproduction des symptômes de botulisme.

L'utilisation d'un modèle animal pour ce projet est nécessaire et ne peut être remplacée par des expériences *in vitro* car il n'est pas possible de reproduire les symptômes de la maladie ou de déterminer les conditions expérimentales permettant de reproduire ces symptômes à partir d'essais *in vitro*. Cependant, le nombre d'animaux utilisés sera réduit autant que possible. Les tests statistiques basés sur les 4 études actuellement disponibles montrent que des lots de 10 animaux sont suffisants pour obtenir les résultats attendus : 60 poulets seront ainsi utilisés pour notre projet. Les animaux seront élevés au sol sur litière en leur apportant des enrichissements appropriés. Un premier essai est programmé. Si l'une des conditions testées lors de ce premier essai permet d'obtenir des signes cliniques de botulisme, ce second essai aura pour objectif de valider le modèle en reproduisant à l'identique la condition expérimentale qui fonctionne. Lors de cet essai il sera également prévu de tester d'autres souches selon cette même condition expérimentale de façon à évaluer la reproductibilité du modèle. Si aucun signe clinique n'est obtenu lors du premier essai, ce second essai consistera à tester de nouvelles conditions expérimentales en se focalisant notamment sur le choix de la souche à tester et son mode de préparation.

La colonisation du tractus digestif des animaux par la souche de *C. botulinum* (prérequis à l'apparition des symptômes d'après les articles disponibles dans la littérature) sera suivie via l'utilisation d'écouvillons cloacaux (méthode non invasive). Les organes (foie, rate, gésier, intestin, caeca) seront prélevés 14 jours après inoculation afin de suivre la dissémination éventuelle du pathogène dans les organes ou suite à la mise à mort des animaux du fait de l'atteinte du point limite (score clinique de 1 sur une échelle de 4: dès apparition des premiers signes de paralysie des animaux). L'analyse des organes permettra de suivre la contamination par *C. botulinum*.

14052 L'hypercalcémie idiopathique infantile (IIH) de type 1 est une maladie rare induite par des mutations perte de fonction de la protéine responsable de la dégradation de la vitamine D. Les patients présentent des niveaux circulants de vitamine D élevés qui conduisent à une hypercalcémie puis des dysfonctions rénales. A ce jour, il n'existe pas de traitement efficace, et ces derniers limitent la croissance de l'enfant et/ou les effets secondaires impactent la qualité de vie.

Nous avons identifié dans des systèmes cellulaires, une molécule diminuant les effets d'un excès de vitamine D, et nous souhaitons à présent valider son potentiel thérapeutique dans des modèles précliniques d'IIH.

REMPACEMENT : les systèmes cellulaires ne sont pas appropriés pour modéliser la complexité de la régulation des niveaux de calcium sérique, cette dernière impliquant de nombreux organes aux fonctions différentes (e. g. intestin pour l'absorption, reins pour l'excrétion, les os pour la résorption). Ces expériences seront réalisées sur des souris mâles et femelles, certaines ayant un phénotype dommageable.

RAFFINEMENT : Certaines souris utilisées dans cette étude étant hypercalcémiques, des modalités de suivi de l'état de santé, des critères d'arrêts ainsi que des points limites seront mis en place (i. e. absence de gain de poids à la puberté, incapacité à s'alimenter, perte de poids de plus de 15 %, poils hérissés). Si nécessaire, des analgésiques seront administrés en fonction de la douleur. L'expertise du laboratoire sur l'étude des voies de signalisation de la vitamine D chez la souris permettra la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées (i. e. points critiques étroitement surveillés). A noter que le traitement devrait améliorer les conditions des souris.

REDUCTION : Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement réfléchis et le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum, tout en s'assurant que les cohortes utilisées permettent de conclure de manière significative.

Ce projet utilisera au maximum 1080 animaux sur 3 ans.

14053 La dépression est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe. Elle représente en ce sens un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression et dans la résistance aux traitements antidépresseurs reste encore limitée à ce jour. De nombreuses données, obtenues notamment dans notre laboratoire, montrent que la composante inflammatoire et immunitaire est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements. L'étude de la voie neuro-immunitaire semble donc un candidat de choix pour le développement de nouveaux traitements alternatifs à la pathologie dépressive.

Le présent projet vise à étudier certains mécanismes neurobiologiques dans les symptômes de type dépressifs induits par le stress chronique de défaite sociale chez la souris. Nous utiliserons des tests comportementaux pour évaluer les dimensions émotionnelle et cognitive. Nous effectuerons également des prélèvements (tissu, sang) pour des analyses neurochimiques et biochimiques. La mise en œuvre de ces approches complémentaires chez un même animal permettra d'établir des corrélations multiples et des résultats à une échelle intégrée, qui ne peuvent être obtenues sur des cultures cellulaires, dans des modèles computationnels ou encore chez l'Homme. Le recours à des modèles animaux adaptés à l'étude des troubles de l'humeur reste une nécessité expérimentale. A terme, les données obtenues permettront d'améliorer la prise en charge de la dépression en clinique. Le modèle expérimental de stress chronique par défaite sociale chez la souris (interaction physique répétée avec un agresseur suivie d'une interaction sensorielle) est reconnu pour induire des comportements de type anxieux et dépressif chez le rongeur et il bénéficie d'une bonne validité éthologique. De plus, ce protocole permet de différencier les animaux en deux sous-populations car 30 à 50 % d'entre eux sont résilients et ne développent pas de troubles du comportement, reproduisant ainsi ce qui est observé dans la population humaine. Le protocole de stress chronique de défaite sociale permet donc d'étudier dans de bonnes conditions les mécanismes neurobiologiques de la résilience et de la susceptibilité aux troubles anxieux et dépressifs. Ce modèle, largement décrit dans la littérature, présente néanmoins de nombreuses variantes avec des résultats variables. Il s'agira donc ici de tester différentes conditions pour la réalisation de ce test (durée d'interaction physique variable, durée d'interaction sensorielle variable). Dans un second temps, après validation des conditions optimales de réalisation du stress de défaite sociale, nous mesurerons l'état inflammatoire central et périphérique des souris, en corrélation avec leur réponse comportementale au traitement thérapeutique par antidépresseur (AD).

Une attention particulière sera portée aux animaux subissant la défaite sociale pour que leurs conditions de vie soient les meilleurs possibles en dehors du développement de troubles anxieux et dépressifs. En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, nous estimons que 12 animaux par groupe expérimental seront nécessaires pour la phase de mise au point des conditions de réalisation du test de défaite sociale. Dans la seconde expérience, les effectifs seront augmentés à 20 souris par groupe, afin de pouvoir identifier les sous-populations sensibles et résilientes.

Les expérimentations décrites dans ce projet seront conduites dans le plus strict respect des règles et lois éthiques en vigueur. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur et l'inconfort (manipulation régulière et suivi quotidien) des animaux. En particulier, les blessures qui pourraient suivre l'étape d'interaction physique seront examinées attentivement et soignées, et la procédure sera arrêtée en cas de blessures trop importantes.

Ceci représente un total de 356 souris sur 2 ans (176 C57/Bl6J et 180 CD1).

14054 L'Anorexie mentale est un Trouble du Comportement Alimentaire restrictif caractérisé par une forte morbidité, une dénutrition sévère (avec un indice de masse corporel souvent inférieur à 16 kg/m² au moment du diagnostic), une peur exacerbée de la prise de poids et une vision altérée du corps. L'Anorexie mentale touche principalement les adolescentes et les jeunes adultes, avec une prévalence comprise entre 0,3% et 0,7%. Cette pathologie peut cependant survenir à tout âge, beaucoup de formes prolongées étant sous-diagnostiquées chez l'adulte. La prise en charge des patients anorexiques est basée actuellement sur des approches symptomatiques de psychothérapie et de renutrition. La renutrition est souvent inconfortable et anxiogène pour les patients anorexiques qui souffrent en parallèle de troubles fonctionnels digestifs. En effet, une majorité de patients anorexiques souffrent de troubles digestifs sévères incluant un ralentissement de la vidange gastrique (gastroparésie), des troubles du transit intestinal (constipation opiniâtre pouvant simuler une inertie colique), des douleurs abdominales et ballonnements. Ces troubles affectent fortement la qualité de vie des patients, contribuent à la pérennisation du trouble anorexique et interfèrent avec les protocoles de renutrition. En conséquence, 40% des patients anorexiques, après 10 années de traitement, présentent toujours des troubles de l'alimentation et des symptômes digestifs et anxieux associés sévères. Le traitement de ces troubles digestifs constituerait donc une stratégie intéressante pour améliorer la qualité de vie des patients et augmenter l'efficacité des traitements actuels contre l'Anorexie mentale.

Notre projet de recherche propose d'étudier une facette encore inexplorée de l'Anorexie mentale, à savoir le rôle du microbiote intestinal dans l'apparition et la persistance de cette maladie, et plus particulièrement dans les troubles fonctionnels digestifs associés. En effet, des données récentes ont montré que la composition du microbiote intestinal des patients anorexiques était altérée par rapport à des individus sains. L'impact de cette dysbiose sur le comportement alimentaire et sur la physiologie intestinale des patients reste cependant complètement inconnu. Notre projet de recherche reposera sur l'utilisation d'un modèle d'Anorexie chez la Souris C57Bl/6 (modèle murin « Activity-Based Anorexia » ou ABA). Ce modèle, un des plus utilisés dans le domaine de l'anorexie, est basé sur un accès restreint à la nourriture pendant 12 jours, combiné à une activité physique volontaire des animaux (accès à une roue d'activité). De façon tout à fait intéressante, les souris soumises au protocole ABA présentent des troubles fonctionnels digestifs proches de ceux retrouvés chez les patients (ralentissement de la vidange gastrique, augmentation de la perméabilité du colon). Nous souhaitons maintenant caractériser le rôle du microbiote intestinal dans l'apparition des troubles fonctionnels digestifs dans ce modèle murin d'Anorexie.

Les expériences planifiées pour la réalisation de ce projet nécessiteront l'utilisation de 600 souris sur une durée de 5 ans. L'ensemble des expériences prévues a été conçu en respectant la règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- « Remplacer » : Ce projet de recherche vise à étudier les interactions entre les bactéries du microbiote et l'intestin, avec notamment une analyse de l'effet du microbiote sur la physiologie intestinale et sur le comportement alimentaire. L'utilisation d'animaux est indispensable pour réaliser cette étude car aucun autre modèle actuel ne nous permet d'étudier ces aspects dans leur globalité.

- « Réduire » : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats et pour avoir des contrôles internes robustes, afin de pouvoir conclure sur le rôle du microbiote dans l'apparition des troubles fonctionnels digestifs dans un modèle murin d'anorexie.

- « Raffiner » : La mise en place d'un suivi strict de points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur des animaux au cours des expérimentations. L'ensemble des expériences sera mené par des personnels qualifiés, dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

L'ensemble des connaissances apportées par ces expériences permettra de mieux comprendre les mécanismes d'apparition et de persistance de l'Anorexie. Nous espérons en particulier identifier de nouvelles approches de traitement de cette maladie en ciblant les troubles digestifs associés à

l'Anorexie. Ces nouvelles approches viendront compléter les approches psychologiques et les protocoles de renutrition actuellement utilisés pour lutter contre cette maladie.

14055 La fibrillation ventriculaire (FV) consiste en des contractions anarchiques et irrégulières des ventricules. Celle-ci rend la fonction de pompe inefficace et peut entraîner la mort sous forme d'arrêt cardiaque. Les canaux ioniques sont des protéines exprimées à la membrane des cellules, y compris des cardiomyocytes et dont certains sont responsables de l'activité électrique cardiaque étudiable via l'électrocardiogramme (ECG). Une altération acquise ou innée de leur fonction peut entraîner des arythmies sous forme de fibrillation ventriculaire.

L'activité électrique cardiaque est assurée par l'ouverture et la fermeture extrêmement coordonnée de nombreux canaux ioniques. Ces canaux ioniques sont des protéines localisées au niveau de la membrane plasmique. Leur ouverture permet le passage sélectif de certains ions (sodium, potassium, calcium et chlore). C'est le mouvement des ions à travers la membrane plasmique qui est responsable de l'activité électrique du cœur.

Par conséquent, une meilleure connaissance des canaux ioniques impliqués dans l'activité électrique cardiaque permet de mieux appréhender le mécanisme de déclenchement de la FV et d'adopter des stratégies thérapeutiques plus efficaces. Le but de cette étude est de mettre en lumière l'implication du canal ionique Transient Receptor Potential 4 (TRPV4) dans l'activité électrique cardiaque chez la souris. Ce canal TRPV4 fait partie de la grande famille des canaux Transient Receptor Potential (TRP) qui sont exprimés de manière ubiquitaire à travers l'organisme. Bien que le canal TRPV4 soit exprimé au niveau des myocytes ventriculaires chez la souris et le rat, ses rôles dans l'activité électrique cardiaque demeurent inconnus.

Les investigations se feront sur des cardiomyocytes isolés obtenus par digestion enzymatique du cœur. L'implication du canal TRPV4 dans l'activité électrique sera étudiée par la technique du patch-clamp. Le patch-clamp permet d'enregistrer les courants ioniques générés par le mouvement des ions à travers les canaux ioniques localisés à la membrane plasmique.

Dans ce projet, nous respecterons la règle des 3R. L'obtention de milliers de cardiomyocytes et la possibilité de réaliser plusieurs investigations par animal représentent un moyen de limiter le nombre d'animaux (réduction), ainsi 45 souris seront utilisées dans ce projet. Durant le projet, des mesures de raffinement seront mises en œuvre. Les animaux sont hébergés dans des cages avec un environnement enrichi, dans une animalerie dédiée. Les animaux sont visités quotidiennement pour la surveillance de leur bien-être. Lors de la procédure expérimentale qui consiste en la réalisation d'un électrocardiogramme, examen indolore et sans danger réalisé en routine chez l'Homme, les animaux seront sous anesthésie générale, leur réveil et leur prise en charge seront réalisés par une personne formée dans des locaux adaptés. Une surveillance des animaux sera faite tout au long de la procédure, de l'anesthésie au réveil (suivi des paramètres vitaux, tapis chauffant...) et une observation de signes cliniques sera réalisée avec la mise en place de points limites adaptés.

A ce jour, il n'est pas possible de remplacer par d'autres approches l'utilisation d'animaux. Seule l'utilisation de souris WT et TRPV4 KO via une approche pharmacologique permettent des investigations préliminaires quant à l'implication du canal TRPV4 dans l'activité électrique cardiaque.

14056 Notre projet vise à comprendre le rôle et l'implication des changements métaboliques à l'origine des cancers cutanés induits par les UVB et notamment dans le cas de maladies rares comme Xéroderma Pigmentosum (XP).

Cette maladie génétique héréditaire se traduit par une sensibilité extrême à la lumière du soleil, et plus particulièrement aux rayons ultraviolets de types B, ce qui oblige les patients à être totalement protégés de la lumière du soleil. Sans cette protection, les malades subissent un vieillissement accéléré de la peau et développent de façon précoce des cancers cutanés et des lésions oculaires. Chez les malades atteints de XP, l'apparition de cancers cutanés peut survenir dès l'âge de 2 ans (et généralement avant 10 ans) et la fréquence d'apparition est 10 000 fois plus élevée que dans la

population générale. Les cancers cutanés, appelés aussi carcinomes, sont également très fréquents chez les personnes qui sont fortement et régulièrement exposées aux rayons du soleil au cours de leurs vies. Ils représentent 90 % des cancers cutanés diagnostiqués en France. Il est, par conséquent, primordial d'axer la recherche sur la compréhension des mécanismes qui sont impliqués dans le processus de carcinogénèse UVB induit afin de mieux les appréhender et les traiter.

Lors de précédents travaux, nous avons mis en évidence d'importants changements au niveau du métabolisme énergétique de la cellule au cours du processus de carcinogénèse. Trois voies majeures ont été identifiées comme étant à l'origine de ces tumeurs cutanées: la réparation de l'ADN, le stress oxydatif et le métabolisme énergétique mitochondrial. Cependant, ces mécanismes sont complexes et étroitement liés car la modification de l'un a un impact sur l'autre.

Par conséquent, au cours de ce projet, notre objectif sera de comprendre quelles interactions existent entre ces différentes voies et comment elles se régulent les unes par rapport aux autres afin de pouvoir les utiliser comme cibles thérapeutiques pour développer des traitements préventifs et/ou curatifs innovants contre les cancers cutanés UVB induits.

Pour cela, nous allons créer des souris génétiquement modifiées pour lesquelles nous allons inactiver, individuellement ou 2 à 2, les gènes d'intérêts (XPC, TFAM, HIF et NOX) de chacune des voies métaboliques impliquées dans la carcinogénèse afin de mieux comprendre les liens qui existent entre elles.

Pour la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser un nombre total de 2855 souris échelonnées sur 5 ans.

Ce projet sera réalisé en prenant en considération la règle des 3Rs :

- Réduire : le nombre de souris utilisé afin d'obtenir les génotypes d'intérêt sera réduit au strict minimum. Pour cela, les souris seront génotypées à chaque étape de croisement pour déterminer si les animaux sont conformes ou non conformes et ainsi pourvoir réduire au minimum le nombre de souris nécessaire pour le croisement suivant. Un tableau de croisement sera également réalisé avant le début de la création de chaque lignée afin d'établir un schéma prédictif de probabilité de la descendance.

- Remplacer : des études *in vitro* menées en cultures cellulaires ont permis de confirmer l'implication de voies métaboliques dans le processus de carcinogénèse. Cependant, les modèles *in vitro* ne représentent pas l'individu dans son ensemble contrairement à des modèles *in vivo* capables de mimer l'impact et les conséquences des irradiations aux UVB sur la peau. De plus, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle de souris génétiquement modifié pour nos gènes d'intérêts qui soit capable de développer des cancers cutanés UVB induits similaires à ceux présents chez l'homme.

- Raffiner : pour la création de nos lignées nous utiliserons dès que possible les outils génétiques les plus modernes et notamment le système inductible CRE/lox qui permet d'inactiver un gène dans un tissu donné à un moment donné. Ce qui signifie que la mutation n'est active que ponctuellement et uniquement dans le tissu cible, permettant ainsi d'obtenir un génotype avec le minimum de conséquence fonctionnelle pour l'animal. De plus, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée afin de s'assurer que les mutations réalisées n'ont aucune conséquence sur le bien-être des animaux. Si toutefois, un animal montre un problème de comportement, de locomotion ou autre des mesures conservatoires (nourriture mouillée dans la cage, biberon à longue tétine, isolement si nécessaire) seront prises afin d'améliorer les conditions d'élevage et le bien-être de nos animaux.

14057 La myxomatose est une maladie majeure du lapin européen due à un virus de la famille des Poxviridae. Elle est encore très présente en France et à l'étranger, tant sur le lapin de garenne que sur les lapins d'élevage, où elle sévit sous 2 formes : la forme nodulaire et la forme amyxomateuse. La forme nodulaire, ou cutanée, est la forme la plus anciennement connue ; encore représentée dans les élevages de type fermier, elle tend à disparaître dans les élevages industriels au profit de la forme amyxomateuse (forme "respiratoire").

Les pertes causées par la myxomatose sont généralement très lourdes et il n'existe actuellement aucun traitement efficace. Le développement de protocoles thérapeutiques contre la myxomateuse

aurait donc un intérêt majeur pour les élevages cunicoles mais aussi pour les lapins de compagnie, qui ne sont pas épargnés par la maladie et qui sont plus souvent médicalisés que les lapins d'élevage.

Récemment, certains nitroporphyrinoïdes de troisième génération, dont le 18-Virco-LB056, ont été identifiés comme inhibiteur de la multiplication du cytomégalovirus humain. Des expériences récentes, réalisées au laboratoire, ont montré que le 18-Virco-LB056 inhibait aussi fortement la multiplication du virus myxomateux en culture cellulaire. Malgré ces résultats encourageants et avant d'envisager une potentielle utilisation de ce composé pour traiter la myxomatose, il est nécessaire d'avoir recours à une phase d'essai sur animal pour confirmer son efficacité *in vivo*.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'évaluer le pouvoir antiviral du 18-Virco-LB056 chez l'espèce hôte naturelle du virus myxomateux, le lapin. Pour cela, 25 lapins, répartis en 3 groupes, seront infectés expérimentalement par le virus myxomateux, puis recevront soit le 18-Virco-LB056, à 2 posologies différentes (groupes 2 et 3, n=10 lapins chacun), soit un placebo (groupe 1, n=5 lapins). Les effectifs des différents groupes ont été calculés de manière à utiliser le nombre minimal d'animaux permettant de mettre en évidence d'éventuelles différences statistiques entre les titres viraux, la réponse sérologique et les lésions tissulaires observés dans chaque groupe.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes seront appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans le décret du 1er février 2013 et les arrêtés ministériels associés, en particulier l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;
- Mise en place de matériel d'enrichissement (rondins végétaux) dans les cages ;
- Manipulation des lapins dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai ;
- Mise en place d'une procédure d'évaluation des points limites spécifiques de la myxomatose permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.

A la fin du projet, tous les lapins seront euthanasiés, afin de permettre la réalisation de prélèvements post-mortem, sur lesquels seront réalisés des analyses virologiques, sérologiques et histologiques.

14058 Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Ce contact avec l'organisme pouvant être prolongé dans le temps (par exemple, lors de l'implantation d'un dispositif médical), des réactions cliniques indésirables liées à une toxicité systémique ou locale sont susceptibles de se manifester.

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

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

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient

les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les rongeurs sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification pour les rongeurs et chainette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

14059 Les douleurs neuropathiques correspondent à un groupe hétérogène de douleurs résultant d'une lésion ou d'une maladie affectant le système nerveux somato-sensoriel. D'un point de vue clinique, elles sont caractérisées par des signes de douleur spontanée (continue ou intermittente) ou de douleur évoquée comme l'hyperalgie (diminution du seuil de douleur et augmentation de la douleur à une stimulation douloureuse) et l'allodynie (douleur à une stimulation non douloureuse) coexistant souvent avec de l'anxiété et des troubles cognitifs. Les douleurs neuropathiques et les comorbidités associées sont particulièrement problématiques à cause de leur sévérité, de leur chronicité, de leur résistance aux analgésiques classiques et à cause de l'efficacité limitée des traitements de référence (antidépresseurs tricycliques et gabapentinoïdes). Parmi les antidépresseurs, les plus efficaces -les tricycliques- sont aussi les plus anciens, et associés à des effets indésirables (EI) sévères, tandis que des antidépresseurs plus récents et mieux tolérés, comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), sont faiblement efficaces.

L'objectif principal de ce projet est de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer les traitements des douleurs neuropathiques et de leurs comorbidités. Les données de la littérature indiquent que cet objectif peut être atteint en réduisant une voie de signalisation couplée à l'activation du récepteur de la sérotonine de type 5-HT₆.

Nous proposons d'évaluer le pouvoir antalgique de substances bloquant les récepteurs 5-HT₆ spinaux et leur capacité à renforcer l'effet des antidépresseurs sur la douleur neuropathique et les comorbidités associées, chez le rat.

Pour ce projet, le recours à l'animal présentant une douleur neuropathique et des troubles cognitifs est indispensable ; son utilisation sera limitée dans le temps (15 j maximum) et interrompue par si l'animal présente des signes d'inconfort ou de douleur perturbant son activité et son bien-être. L'effectif maximal calculé pour atteindre les objectifs est de 320 rats, il a été déterminé par la puissance des tests statistiques et la grandeur de la variation attendue. Notre projet respecte donc la règle des 3R, la réduction du nombre d'animaux utilisés, le raffinement dans les procédures (avec surveillance et mise à l'écart des animaux présentant une altération de l'état général) et remplacement par des techniques *in vitro* quand cela est possible.

14060 Parmi les différents types de cancer du sein, les plus fréquents sont hormono-dépendants ou exprimant la protéine de surface HER2. Ils sont aujourd'hui traités par des thérapies ciblées très efficaces. Mais près de 20% des patientes ont une tumeur dite « triple négative » (TNBC), caractérisé par l'absence de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone et du facteur HER-2, ce qui les empêche de bénéficier de thérapie ciblée déjà existante. La chimiothérapie reste alors le traitement standard mais avec une efficacité assez limitée. Dans les dernières années beaucoup de progrès ont été fait en termes d'analyse génomique. Notre équipe a observé que certains gènes sont altérés dans des sous groupes de patientes porteuses d'un cancer TNBC. L'un de ces gènes est particulièrement important pour les cellules tumorales et sa fonction peut être rétablie par une thérapie ciblée, ce qui ouvre de nouvelles possibilités de traitement pour ces patientes.

Il n'existe pas de lignées tumorales mammaires triple négative porteuse de cette mutation et l'objectif du projet est de créer un nouveau modèle pertinent à partir de tumeurs humaines de patientes afin d'avoir un outil pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques qui ciblent ce gène.

Concrètement, ceci signifiera de greffer des petits fragments de tumeurs humaines TNBC mutées pour ce gène sur des souris pour les amplifier et générer dans un second temps des lignées tumorales *in vitro*. En pratique, ce projet consiste donc à utiliser des xénogreffes de tumeurs TNBC mutées pour ce gène afin d'établir des modèles cellulaires *in vitro* et réaliser des tests des nouvelles molécules thérapeutiques qui le ciblent. La conception du projet prend en compte la règle des 3R :

Remplacer : L'objectif de ce projet étant la mise en place de modèles cellulaires permettant par la suite d'évaluer l'effet de nouvelles stratégies thérapeutiques, cela ne peut pas être remplacé par des modèles *in vitro* ou *in silico*. En effet, l'établissement d'une nouvelle lignée cellulaire tumorale à partir de cellules de cancer de patientes passe nécessairement, au moins dans un premier temps, par une amplification des cellules tumorales sur animaux réceptifs (immunodéficients). Ceci permet de conserver les interactions entre cellules, l'architecture tissulaire de la tumeur d'origine, et d'approcher au mieux microenvironnement de la tumeur.

Réduire : Les expériences testant les molécules pharmacologiques seront remplacées par des études *in vitro* sur cellules et non sur l'animal lui-même. Le nombre d'animaux utilisés pour le projet sera de 94 souris afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules pour établir les modèles cellulaires *in vitro*. Par la suite, l'essentiel des tests sera fait sur cellules dérivées des tumeurs établies sur souris.

Raffiner : Les souris sont hébergées en locaux confinés dans des portoirs ventilés, avec eau et nourriture ad libitum. Les animaux seront au nombre maximum de 5 par cage et bénéficieront d'un enrichissement. Aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage. Ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses réalisées par un personnel formé et vigilant quant à la détection de points limites (suivi quotidien de l'état de santé des animaux et contrôle du poids très régulièrement). L'utilisation d'analgésiques évitera toute souffrance aux animaux.

Les modèles générés constitueront des outils très importants pour aider les chercheurs et les médecins à comprendre et lutter efficacement contre ce cancer au pronostic sombre.

14061 La coqueluche, maladie infectieuse respiratoire induite par la bactérie *Bordetella pertussis*, est encore aujourd'hui une cause importante de mortalité infantile et reste un réel problème de Santé Publique même dans les pays à forte couverture vaccinale. En 2014, le nombre de cas de coqueluche a été estimé à 24 millions à travers le monde. Toujours cette même année, 160700 enfants âgés de moins de 5 ans sont morts de cette maladie.

Les programmes de vaccination actuels, malgré une couverture vaccinale estimée à 87%, offrent une protection du nourrisson qui n'est pas complète avant le 6ème mois. Or il est connu aujourd'hui que l'entourage proche représente la source majeure de contamination de l'enfant par le phénomène appelé cocooning.

De ce fait, la communauté scientifique commence à pointer du doigt le manque d'efficacité des vaccins acellulaires présents sur le marché car d'une part, ces vaccins ont une durée de protection assez faible, d'où la nécessité de revacciner régulièrement et d'autre part, ces vaccins protégeraient contre les effets de la maladie mais pas contre la transmission de la bactérie qui serait toujours présente dans le tractus respiratoire.

Le programme européen PERISCOPE (PERTussIS COrrelates of Protection Europe) est un consortium de 22 partenaires qui a pour buts d'accélérer le développement de meilleurs vaccins et/ou d'améliorer les stratégies vaccinales mais aussi de mieux comprendre la pathogenèse de l'infection à *Bordetella pertussis* pour mieux appréhender les changements observés en épidémiologie.

Concrètement, des études de la réponse immunitaire et de la protection contre la souche virulente induites par les vaccins vont être menées chez l'Humain et dans le modèle babouin. Dans notre équipe, nous allons étudier plus précisément et profondément ces aspects dans le modèle murin car les techniques adaptées sont plus simples à mettre en œuvre que chez l'Humain ou le babouin.

Pour ce faire, nous allons réaliser des expériences de vaccination (pour mesurer les réponses immunitaires induites) et de protection contre différentes souches cliniques virulentes (pour mesurer l'efficacité des différents vaccins), et ce dans différents types de souris, BALB/c, C57 BL/6 mais aussi dans des modèles de souris KO (IL-17, PIGR, ou d'autres modèles qui seront déterminés également dans le cadre de PERISCOPE, tels que les IFNg KO).

Nous avons très à cœur de respecter la règle des 3R. Nous réduirons au maximum le nombre nécessaire de souris par groupe pour respecter les minimas statistiques. De plus, si cela devait se présenter en fonction du modèle de souris KO que nous serions amené à utiliser, nous serons extrêmement vigilants sur le respect de la notion de points limites, notamment en ce qui concerne les paramètres de prostration, perte de poids, poil hérissé etc...

Au vue de la procédure expérimentale, des différentes doses de vaccins et espèces de souris ainsi que des différentes souches cliniques de Bordetella pertussis à étudier, nous aurons besoin de 3000 souris au total pour le projet.

14062 Le foie est un organe unique chez les mammifères qui possède une capacité à se régénérer remarquable. Après l'ablation des deux tiers (2/3) du foie, celui se regenère pour retrouver sa masse initiale. Cette ablation est le modèle le plus utilisé pour étudier la régénération du foie.

Dans ce projet, nous voulons voir si les voies de régulation impliquées dans la régénération du foie sont liées à la sénescence. La sénescence est le processus de vieillissement biologique. Plus particulièrement, nous allons voir à quel moment après l'ablation des deux tiers du foie, les cellules sénescents apparaissent. Cette étude sera aussi faite dans des souris où il n'y a pas de sénescence afin de voir si la régénération du foie sera tout aussi efficace.

L'objectif de ce projet est d'étudier si le processus de sénescence a des effets bénéfiques ou néfastes sur le processus de régénération du foie. La réalisation de ce projet fera avancer notre compréhension de la régénération des tissus et pourrait mener au développement de médicaments qui améliorent le processus de régénération dans de nombreux tissus.

Nous aurons besoin de 920 animaux au total, respectant les règles 3R:

i) Réduction: Comme il s'agit d'un protocole bien établi, cela nous permettra de minimiser le nombre de souris utilisées.

ii) Raffinement: Toutes les interventions sont réalisées sous anesthésie générale. Un traitement anti-douleur est prévu pour limiter les souffrances en pré- et post-opératoire.

iii) Remplacement: Comme ce projet étudie la régénération du foie et les gènes qui sont associés, la souris est le seul modèle où cette étude est possible. En effet, la souris est un mammifère capable de régénérer son foie à la suite d'une hepatectomie partielle. En outre, notre projet consiste à étudier le rôle de la sénescence dans la régénération du foie au niveau moléculaire, et nécessite l'utilisation de souris génétiquement modifiées, déficientes en gènes clés régulant la voie de sénescence. De telles ressources génétiques ne sont pas disponibles dans d'autres modèles animaux.

14063 Lors d'altérations continues des pressions et débits au sein des vaisseaux, ceux-ci développent une modification durable de leurs structures pour permettre de normaliser les changements hémodynamiques : le remodelage vasculaire. Il se traduit par une correction du diamètre interne du vaisseau et de son épaisseur de paroi. Ce remodelage a été principalement décrit au niveau artériel laissant un rôle passif à la veine. Des études réalisées par de nombreuses équipes ont permis de mettre en évidence l'importance d'une source d'inflammation corrélée au remodelage. Notamment par l'augmentation d'un recrutement des neutrophiles et des macrophages participant à la dégradation de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de métalloprotéases matricielles (MMP-2 et MMP-9). Cependant, même si elles sont histologiquement et fonctionnellement différentes, une veine est toujours couplée à une artère. De plus, le haut débit artériel rend peu possible un recrutement immunitaire intra-artérielle. Dans ce cadre, nous voulons étudier si une interaction est possible entre la veine et l'artère par l'intermédiaire du système immunitaire. En effet, cette collaboration a été mise en avant dans le cadre du remodelage artérielle et de l'athérosclérose. L'objectif de cette étude est de décrire cette interaction artère-veine dans une autre pathologie à

forte composante inflammatoire qui est l'anévrisme de l'aorte abdominale. Nos hypothèses sont doubles. Il sera nécessaire de comprendre si la veine capte directement les modifications hémodynamiques puis interagit avec l'artère, ou si l'artère transmet d'abord l'information à la veine qui induira ensuite un recrutement immunitaire. Après avoir caractérisé l'interaction artérioveineuse, nous nous concentrerons sur la mise en place de celle-ci lors de l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA). En bloquant spécifiquement la veine, nous pourrions étudier son effet sur l'évolution de la pathologie et faire de celle-ci une potentielle cible thérapeutique. Cette étude est la continuité de l'étude « Rôle du système immunitaire dans la relation artérioveineuse normale et pathologique » qui a déjà une autorisation.

Cette étude sera réalisée sur un total de 480 souris LDLr KO, C57BL6/J et CD45, dans le respect de la règle des 3 R:

REMPLEUR

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro*, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal d'une part et la collaboration de différents organes d'autre part.

REDUIRE

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Une analyse statistique des résultats sera réalisée en continue (analyse de variance ANOVA).

RAFFINER

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux, de plus les cages sont enrichies par des jouets (tubes, copeaux...).

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine. L'analgésie préopératoire est assurée par des injections sous cutanées de buprénorphine (0.1 mg/kg, par g de souris) La réponse nociceptive des animaux sera régulièrement testée en cours d'intervention (toutes les 15 minutes). Les éventuelles modifications du rythme cardiaque et respiratoire seront observées pour évaluer la souffrance, la détresse et l'inconfort des animaux pendant l'intervention chirurgicale.

Évaluer la douleur de l'animal quotidiennement jusqu'au sacrifice.

Dans les premiers jours et en cas de souffrance de l'animal (prostration, agressivité, anorexie, ...), injection à nouveau de buprénorphine (Temgésic®).

L'analyse statistique des résultats sera réalisée par analyse de variances ANOVA suivie d'un test posthoc LSD.

- 14064** Des désordres de la reproduction féminine sont associés à des taux anormaux de LH, une gonadotrophine contrôlant l'ovulation. Dans le cadre de travaux pratiques (TP) de Master1, nous souhaitons confronter les étudiants à l'évaluation de ce paramètre sur des souris adultes femelles. Les résultats obtenus par les étudiants seront comparés à des résultats issus de la littérature obtenue sur des souris exposées à un régime obésogène et diabétogène pendant 2 mois et qui présentent un taux anormalement bas de LH. Ainsi, les étudiants pourront évaluer l'impact physiologique d'un régime gras et sucré sur un élément central de l'axe hypothalamo-hypophysaire. 8 souris adultes femelles seront utilisées par séance de TP soit 40 souris sur la durée du projet (5 ans). Pour le dosage de LH, nous réaliserons, sous anesthésie, un prélèvement de sang intracardiaque. Les animaux seront mis à mort avant réveil et des prélèvements d'organes associés à la reproduction (ovaires, hypophyse) seront réalisés. Le prélèvement de sang et les prélèvements d'organes seront réalisés par les étudiants. La mise à mort sera, quand-à elle réalisée par l'enseignant expérimenté. Dans cette étude physiologique à visée pédagogique, seul le modèle *in vivo* permet d'évaluer le dosage de LH. De manière à satisfaire les 3 R (réduction, raffinement et remplacement) nous avons choisi de ne pas imposer de régime obésogène et diabétogène à la

souris et d'utiliser des données bibliographiques déjà publiées. D'autre part, Toutes les précautions possibles (habituation, stabulation des animaux avec enrichissement ...) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort et la souffrance des animaux.

14065 De nombreuses molécules sont développées à des fins thérapeutiques, mais l'accès de ces molécules au cerveau et à leurs cibles au sein du tissu cérébral est encore très restreint. Cela pose des contraintes fortes pour le développement de traitements efficaces pour les maladies du cerveau. Notre projet vise à développer une méthode d'encapsulation qui permet la libération contrôlée dans le temps, l'espace et avec des concentrations précises de molécules. Pour cela, des microparticules ont été développées pour contenir des molécules en quantités contrôlées et pouvoir libérer leur contenu à la demande.

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

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

Le nombre d'animaux estimés pour cette étude princeps est justifié par les différents temps post-chirurgie à analyser, afin d'avoir une cinétique suffisamment précise du devenir des particules lorsqu'elles sont injectées dans le cerveau. Pour tous les groupes, le nombre d'animaux est limité au strict nécessaire pour garantir la significativité. Les 160 animaux seront divisés en 4 groupes : 2 groupes pour l'imagerie *in vivo* et 2 pour l'imagerie *ex vivo*. Pour chaque type d'imagerie, des injections dans le tissu cérébral seront comparées à des injections dans les ventricules cérébraux (poche de liquide dans le cerveau qui permet la communication entre le cerveau et la circulation sanguine/lymphatique de l'organisme). L'utilisation de l'imagerie *in vivo* dans ce projet est destinée à réduire le nombre d'animaux utilisés, puisqu'un même animal peut être observé à différents temps pour établir une cinétique. La durée du projet étant de 2 ans, cette étude représente l'utilisation de 80 animaux/an.

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

La première étape de ce projet innovant est indispensable afin d'apporter une preuve de concept en terme de faisabilité, d'efficacité et de non-toxicité de cette nouvelle approche. Cette étude

préclinique a pour ambition à terme d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies neurologiques, neuropsychiatriques et neurodégénératives.

14066 Les modèles animaux de cancer humain et murin demeurent des éléments critiques dans la compréhension de la physiopathologie du cancer, l'identification de nouvelles cibles et de nouveaux candidats médicaments et la compréhension des mécanismes de résistance. Le modèle d'injection de cellules en orthotopique, c'est-à-dire une greffe réalisée dans un tissu correspondant à celui de la tumeur d'origine, permet d'examiner de larges cohortes de tumeurs dont la croissance et la réponse aux médicaments peuvent être évaluées. Les modèles orthotopiques sont plus complexes à produire puisque nécessitant une approche invasive ou chirurgicale pour injecter les cellules en comparaison du modèle de greffe standard en sous-cutané, dit modèle hétérotopique, mais la prédictivité du modèle est plus importante. L'injection, par exemple, des cellules de glioblastome dans le cerveau ou de cellules de cancer du sein dans la glande mammaire correspondra à une meilleure analyse étiologique des tumeurs. En effet, ce type de modèle permet d'analyser l'effet de molécules sur le microenvironnement « normal » des tumeurs mais aussi sur la formation de métastases, sachant que les métastases sont la principale cause de mortalité liée au cancer. Dès lors les modèles orthotopiques représentent des modèles d'intérêt en recherche translationnelle offrant une analyse plus prédictive de la réponse thérapeutique des substances à tester sur les différents stades de progression de tumeurs. Dès lors l'utilisation d'animaux vivants est donc nécessaire afin de tester de nouvelles substances pharmacologiques.

Les procédures décrites dans ce projet correspondent à la création de différents modèles de tumeurs chez le rongeur. L'objectif de ce projet est de créer différents types de tumeurs chez la souris ou le rat, après administration de cellules tumorales, de mesurer différents critères (taille de la tumeur, survie) et de tester l'efficacité ou la toxicité de molécules aux propriétés anticancéreuses décrites ou potentielles.

La création de ce type de modèle dans ce projet ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car l'induction de tumeur s'accompagne de modifications physiopathologiques et de la création du microenvironnement spécifiques ne pouvant actuellement pas être reproduites *in vitro*, ces modifications étant nécessaires pour l'étude d'efficacité d'anticancéreux.

L'utilisation de la souris ou du rat comme espèce hôte se justifie par le fait que ces espèces développent rapidement des tumeurs après injection de cellules tumorales et qu'il s'agit des espèces les mieux décrites dans la littérature.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test sera optimisé de façon à permettre une interprétation correcte des résultats en se basant sur une analyse de puissance suffisante pour les tests statistiques à appliquer, limitant ainsi une répétition du test.

Le projet consistera à développer différents modèles puis à tester des molécules de référence connues pour avoir une activité anti-cancéreuse mais aussi des molécules non encore décrites. Le développement consistera à définir un nombre suffisant de cellules pour générer une tumeur chez l'animal. Dans ce cadre, 3 à 4 concentrations de cellules seront testées avec un minimum de 3 animaux par groupe. Dans un second temps, un effectif de 8 à 14 animaux par groupe sera utilisé pour évaluer l'efficacité et la toxicité de molécules. Un test comportera minimum trois groupes (un contrôle, un anticancéreux de référence, et au minimum une dose de substance test), soit un minimum de 24 animaux par test. Ainsi en se basant sur une soixantaine de modèles à développer et tester pendant ce projet, nous estimons à 1980 le nombre d'animaux qui seront utilisés par an (i. e. 5940 sur trois ans de projet).

Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale est mis en œuvre grâce à l'utilisation de points limites clairement établis (incluant une surveillance de l'aspect général, un suivi de poids, ...), permettant d'euthanasier tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Le programme d'anesthésie et d'analgésie est défini par un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. De la même manière, lorsque les protocoles l'exigent, les chirurgies sont raffinées au maximum, en mettant à disposition des animaux, de l'oxygène à concentration ajustable et des tapis chauffants. Aussi, il

est mis en place un enrichissement complet dans leur hébergement, sous la forme de jouets, litière, objet de nidification, objet à ronger ou mastiquer, présence de congénère.

14067 Dans le cadre de la formation continue vétérinaire, l'apprentissage de l'examen ophtalmologique du cheval nécessite une formation spécifique, avec entraînement à la réalisation d'actes techniques tels que la réalisation d'échographies oculaires ou la réalisation d'un examen ophtalmologique adapté avec tests des réflexes oculaires en particulier. Cet apprentissage implique l'utilisation de chevaux *in vivo*, et peut être effectué au cours d'enseignements post universitaires.

Quatre ponettes par session seront imagées soit douze ponettes au total pour trois sessions.

La règle des 3R a été respectée comme suit :

- Remplacement : des premiers examens seront réalisés sur des têtes prélevées à l'abattoir afin que les stagiaires appréhendent au mieux l'examen sur animal vivant. Cet examen *in vivo* est cependant indispensable pour visualiser les structures de l'œil, les variations inter individuelles, la vascularisation et réaliser les tests oculaires.

- Réduction : 15 stagiaires en moyenne sont prévus à ces sessions. Le nombre d'animaux utilisés a été déterminé à minima selon les objectifs de formation devant être obtenus lors des travaux pratiques. Nous examinerons les deux yeux de chaque ponette afin que chaque stagiaire puisse s'entraîner correctement sur un œil à minima.

- Raffinement : les animaux seront tranquilisés afin d'éviter le stress lié à ces nouvelles manipulations et aux personnes inconnues. Le personnel habituellement en charge des soins sera toujours à proximité afin de rassurer les animaux et d'intervenir si besoin était. Une anesthésie locale de l'œil sera réalisée pour limiter autant que faire se peut les stimuli désagréables. Chaque session se déroulera dans le calme. Un congénère sera placé à proximité pour limiter le stress de l'isolement.

14068 Avec le vieillissement de la population, la maladie d'Alzheimer touche de plus en plus de personnes et aucun traitement efficace n'est connu à ce jour. La découverte de nouveaux traitements repose en grande partie sur une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires en jeu dans le déclenchement et la progression de la maladie. A l'heure actuelle la principale hypothèse de travail repose sur l'accumulation du peptide beta amyloïde (A β) dans le cerveau, hypothèse développée suite à l'identification des gènes mutés dans les formes familiales de la maladie. Ainsi la plupart des études précliniques sur animaux sont réalisées sur des modèles d'animaux génétiquement modifiés pour ces gènes. Cependant 95% des cas de maladie d'Alzheimer sont des formes sporadiques dans lesquels ces gènes ne sont pas touchés. Il est donc nécessaire d'élargir nos connaissances sur les événements à l'origine du développement de la maladie.

De nombreuses observations suggèrent un lien entre vieillissement, myéline, cognition et maladie d'Alzheimer. La myéline est une gaine enveloppant les axones et permettant l'accélération du signal nerveux et la protection des neurones. C'est le composant principal de la substance blanche. Récemment, il a été montré que la myéline subit un remodelage permanent tout au long de la vie en fonction des expériences vécues (apprentissage, maladies...). Cela est possible notamment grâce à la persistance dans le cerveau adulte de cellules immatures capables de générer de nouveaux oligodendrocytes (les cellules responsables de la formation de myéline) : ce sont les progéniteurs d'oligodendrocytes (appelés « OPC »). Nous avons développé au laboratoire une lignée de souris dans laquelle il est possible de détruire spécifiquement les OPC dans le cerveau adulte, nous permettant ainsi d'évaluer l'importance de ces cellules et du remodelage de la myéline au cours du vieillissement.

Nous proposons d'explorer le lien entre myéline et maladie d'Alzheimer dans un modèle murin non génétiquement modifié de la maladie d'Alzheimer, en adressant les questions suivantes : observe-t-on chez ces animaux des défauts de myéline ou des cellules qui la produise (les oligodendrocytes), et si oui, ces défauts précèdent-ils ou suivent-ils les premiers signes de la maladie ? S'ils les précèdent, alors ces altérations de la myéline pourraient jouer un rôle dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Est-il possible d'induire les signes pathognomoniques de la maladie

d'Alzheimer uniquement en empêchant le remodelage permanent de la myéline ? Dans un modèle non transgénique de la maladie d'Alzheimer, celle-ci se développe-t-elle plus précocement ou plus sévèrement si l'on empêche ce remodelage de la myéline de façon expérimentale ?

Ce projet se fera dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R. Le nombre de souris nécessaire a été calculé à l'aide de tests statistiques afin d'obtenir des données fiables et reproductibles ; chaque souris offrira de multiples informations grâce à des niveaux d'analyse variés (tests comportementaux et tests biochimiques et/ou histologiques). Sur 5 ans, nous projetons d'utiliser un total de 520 souris. Les animaux seront surveillés quotidiennement et la douleur, si elle se présente, sera évitée au maximum par l'administration d'antalgiques (notamment en pré et post-opératoire). Les conditions d'hébergement des souris seront adaptées aux besoins physiologiques de l'animal (en groupes sociaux, cycle jour-nuit, nourriture et boisson ad libitum) avec un enrichissement environnemental (cages contenant des barres de bois à ronger, du coton pour la nidification ou des dômes pour se cacher).

14069 La pollution particulaire revêt une importance environnementale et sanitaire majeures en accord avec des contraintes sociétales de plus en plus marquées. En effet, l'OMS (2016) estimait que la part de responsabilité de la pollution de l'air extérieur dans les décès prématurés était prépondérante (pathologies cardio-vasculaires et pulmonaires multiples).

Dans le secteur du transport, l'amélioration des dispositifs de filtration des particules à l'échappement a contribué à faire émerger l'importance relative des particules hors combustion : particules d'abrasion des revêtements, de pneumatiques et particules de dispositifs de freinage. Ces dernières présentent notamment des concentrations relativement élevées dans les endroits clos tels que les enceintes ferroviaires souterraines comme l'a décrit l'ANSES dans la saisine du 09/2015 pointant la nécessité de pouvoir fournir aux autorités réglementaires des informations pertinentes quant à la toxicité potentielle de ces particules au regard de leur composition physico-chimique, notamment dans des études chronique ou sub-chronique.

Ce projet d'une durée de 3 ans, vise donc à améliorer les connaissances sur la toxicité des particules de dispositifs de freinage collectés par l'utilisation d'un dispositif contrôlé de génération des particules de frein (banc d'organe développé lors d'un précédent projet) et une approche toxicologique chez le rat. Peu d'études font le lien direct entre les émissions de particules de frein et leurs effets toxiques, justifié par la complexité des systèmes techniques à mettre en œuvre. L'originalité du projet réside dans l'analyse de l'ensemble de la chaîne depuis la production de particules en conditions maîtrisées et reproductibles de freinage à leurs effets cytotoxiques *in vivo*.

La nature discontinue des émissions permettant difficilement de contrôler une dosimétrie lors d'une exposition en continu en phase aérosol, le choix de la voie d'exposition pour cette étude s'est porté sur l'instillation intra-nasale de particules de frein pour arriver à définir des doses toxicologiques de référence pour ces matériaux et de maîtriser l'expologie de l'animal. De même, elle a été également préférée à une approche sur cultures cellulaires, qui bien qu'ayant montrée des résultats intéressants sur cellules épithéliales pulmonaires, est dépourvue des mécanismes de défense systémique du modèle animal et de clairance pulmonaire fondamentales pour une étude de toxicologie respiratoire. Dans ces conditions, l'utilisation de l'animal est indispensable.

L'approche par instillation intra-nasale des particules issues de systèmes de freinage permettra de déterminer par des études cytopathologiques pulmonaires, la distribution particulaire et la survenue de lésions morphologiques. Ces paramètres seront confirmés par des analyses sanguines (numération et formule sanguine, paramètres de coagulation) et la détection du recrutement leucocytaire dans le liquide broncho-alvéolaire. D'un point de vue mécanistique, la présence d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire seront évaluées sur le tissu pulmonaire par des approches de biochimie et de biologie moléculaire. La caractérisation du potentiel oxydant des particules de frein ainsi que leur localisation subcellulaire par microscopie électronique compléteront l'étude.

Ce projet s'articule en 2 parties. Une étude préliminaire en phase aigüe, sujet de cette saisine, consistera, après une instillation intra-nasale unique de suspensions particulaires issues de

systèmes de freinage, d'identifier 2 concentrations particulières induisant un effet observable. Puis, la seconde partie de l'étude, qui fera partie d'une nouvelle demande d'autorisation, consistera en l'exposition subaiguë par administration intra-nasale des 2 doses retenues précédemment à raison d'une instillation quotidienne sur 5 jours par semaine et pendant 4 semaines.

Pour cette étude préliminaire, le nombre d'animaux est réduit au minimum et sera limité à 20 rats Wistar répartis sur 5 groupes : un groupe Témoin (liquide vecteur - sérum physiologique) et 4 groupes à des concentrations différentes en particules de freinage représentant des doses exacerbées rencontrées dans les tunnels ferroviaires (0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg, 2.5 mg/kg et 5 mg/kg). Pour limiter l'inconfort que pourrait générer l'instillation intranasale des doses de suspension particulaire, un anesthésique local sera appliqué au niveau de la sphère nasale.

24 heures après instillation intra-nasale, les animaux seront analgésiés et anesthésiés selon les exigences réglementaires européennes. Des paramètres hématologiques, cytologiques et histologiques seront évalués pour identifier des effets notables des doses de particules de frein instillées et sélectionner ainsi 2 concentrations particulières pour la réalisation, par la suite, de l'étude subaiguë.

Suivant les préconisations des 3R, une attention particulière est faite afin d'anticiper et de prévenir toute forme de souffrance chez les animaux. Notamment, une attention particulière sera faite pour les animaux ayant reçu les doses de suspension particulaire par application de points limites prédéfinis. Ce suivi sera effectué par un personnel qualifié et expérimenté.

Concernant le raffinement des procédures expérimentales, un soin particulier au bien-être des animaux est dédié.

Ceux-ci arrivent en livraison par un transporteur agréé. Les animaux sont pris en charge et bénéficient d'une période d'acclimatation dans un environnement climatisé entre 19 et 21°C avec accès ad libitum à l'alimentation et l'eau. Les cages (2 rats par cage), sont enrichies et conformes aux normes européennes. Les groupes sociaux formés à la livraison seront maintenus jusqu'à la mise à mort des animaux. Pendant une période d'acclimatation d'une dizaine de jours, un entraînement quotidien sera effectué par manipulation des animaux en vue de réaliser une procédure « fantôme » d'instillation intra-nasale limitant ainsi le stress le jour de la réalisation de la procédure.

14070 La mémoire est une faculté essentielle qui permet d'acquérir et de stocker des informations pour ensuite adapter un comportement en fonction de l'expérience. Dans certains cas cependant, une augmentation pathologique de certains processus mnésiques peut aboutir à des troubles psychiatriques comme le stress post-traumatique. De nombreuses études ont montré que les oscillations cérébrales ont un rôle crucial pour ces différents processus. Ces oscillations cérébrales sont visibles pendant l'éveil mais également pendant les différentes phases du sommeil. Outre la restauration des ressources énergétiques, les oscillations du sommeil participeraient également à différentes fonctions cognitives, en particulier la consolidation de la mémoire.

Le but de notre équipe de recherche est donc d'étudier le sommeil et plus généralement les différents états de vigilance et leur rôle dans la consolidation de la mémoire. Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes neuronaux du sommeil afin de les manipuler pour augmenter les capacités mnésiques ou au contraire pour les diminuer dans le cas du stress post-traumatique. Enfin nous souhaitons tester l'hypothèse selon laquelle une dérégulation chronique des processus liés à la consolidation de la mémoire pendant le sommeil pourrait être impliquée dans le développement de certaines maladies comme la dépression.

Pour cela, nous allons enregistrer l'activité neuronale et la manipuler chez le rongeur en comportement. Ces expériences nous permettront d'identifier des liens entre l'activité du cerveau et le comportement normal ou pathologique, comme cela a été observé dans certaines maladies comme la dépression.

Ces expériences nécessitent d'enregistrer l'activité de grandes populations de neurones pendant le comportement, nous utiliserons donc le rongeur qui est le modèle le plus adéquat pour ces expériences qui ne peuvent être réalisées *in vitro* ou *in silico* (Remplacer). Les expériences ont été

pensées de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux requis pour ces expériences (Réduire). Ce nombre sera gardé au minimum nécessaire afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus et ainsi permettre leurs interprétations. Enfin les expériences ont été pensées pour répondre à la question scientifique tout en réduisant au maximum l'inconfort, en limitant les contraintes au cours des procédures et en préservant le bien-être des animaux (Raffiner). Le projet sur 5 ans comprend 35 groupes expérimentaux et un maximum de 927 souris.

14071 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en neurologie (ex : chirurgie d'hernie discale). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les petits ruminants et les lagomorphes sont des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain. Les porcins et les rongeurs peuvent également être utilisés dans des cas particuliers et l'utilisation du modèle canin est envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 800 lapins, 500 ovins/caprins, 200 rats, 150 porcins et 150 chiens soit un total de 1800 animaux.

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

ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

14072 Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils représentent une source potentielle de réactions indésirables comme une réponse fébrile ou des réactions de toxicité systémique.

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

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs (souris, cobayes) et de lapins. Le nombre d'animaux est défini dans les textes de référence (ex : pharmacopée européenne...). Le nombre estimé d'animaux utilisés sur ce projet est de 1250 souris, 500 cobayes et 9000 lapins soit un total de 10750 animaux sur 5 ans.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite si nécessaire grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les rongeurs sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sur litière. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes hébergés individuellement, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (bâton à ronger pour les rongeurs et chainette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

14073 Les renforts tissulaires implantables permettent le développement de techniques chirurgicales mini-invasives dans le traitement des hernies, améliorant ainsi la prise en charge des patients en réduisant les complications post-opératoires. Ils offrent donc des solutions adaptées à chaque technique opératoire et spécifique à chaque site anatomique. Depuis 1999, plus de 5 millions de patients ont été implantés.

Le corollaire à ces techniques chirurgicales minimalement invasives est le développement de techniques d'imagerie non invasives et non ionisantes. Le projet faisant l'objet de cette demande d'autorisation est dédié à la caractérisation non invasive par Imagerie de Résonance Magnétique de la détectabilité de nouveaux renforts tout au long de leurs cycles de vie ainsi que les éventuelles modifications tissulaires induites par ces derniers. La chirurgie nécessaire à l'implantation de ces renforts se fera dans le respect de la norme ISO 10993-6 : 2016, les rats étant sous anesthésie générale associée à une prise en charge de la douleur par injection per-opératoire et post-opératoire de buprénorphine.

20 animaux seront nécessaires pour répondre à la question scientifique posée et le recours systématique à l'IRM permettra le suivi longitudinal de ces groupes et autorisera d'en réduire le nombre d'individu par groupe et donc de contribuer significativement à la règle des 3R. Le bien-être des animaux sera également pris en compte par l'enrichissement des cages. Le test statistique utilisé pour cette étude sera un test exact de Fischer en attribut pass/fail.

14074 Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie qui commence par une inflammation de la membrane synoviale. Tous les tissus articulaires peuvent être atteints et le liquide articulaire s'accumule, d'où le gonflement de l'articulation. Ce gonflement est aussi dû à l'accumulation et à la prolifération de cellules. Des cellules du système immunitaire (lymphocytes, monocytes, cellules dendritiques et granulocytes) sortent des vaisseaux sanguins et parviennent dans la cavité articulaire. Le modèle d'arthrite induit par le collagène de type II est le modèle le plus utilisé mimant la pathologie humaine.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De tels traitements ont fait l'objet d'essais cliniques dans différentes pathologies de l'inflammation comme les molécules inhibitrices du TNF-alpha (une des principales cytokines sécrétées par le système immunitaire innée et responsable de l'inflammation). Seulement, l'effet de ces molécules n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires. Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés sera de 280 souris (réparties selon 4 axes, et 7 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher.

14075 Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Au sein de ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Les vascularites correspondent à une inflammation des vaisseaux sanguins, qui s'accompagne souvent d'ischémie, de nécrose et d'inflammation des organes. Tous les vaisseaux sanguins

(artères, artérioles, veines, veinules ou capillaires) peuvent être touchés par la vascularite. Les manifestations cliniques des troubles spécifiques de la vascularite varient selon la taille et l'emplacement des vaisseaux concernés, le degré d'implication des organes et le degré et le motif d'inflammation.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été réalisés dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. Différents types de traitements sont utilisés afin de diminuer la réponse inflammatoire comme l'utilisation de corticostéroïde, de cyclophosphamide ou de rituximab (anticorps anti-CD20). Seulement, l'effet de ces molécules ne sont pas spécifiques à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapies cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés sera de 280 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique et afin de suivre au maximum la règle des 3R. Concernant le raffinement, le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher.

14076 L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie caractérisée par une pression anormalement élevée du sang dans les vaisseaux sanguins (Pression artérielle systolique (PAS) ≥ 140 mmHg et/ou pression artérielle diastolique (PAD) ≥ 90 mmHg). Dans l'immense majorité des cas, l'HTA est dite essentielle car aucune cause connue ne peut expliquer son apparition. Néanmoins, elle peut être secondaire à d'autres maladies cardiovasculaires et/ou métaboliques ou à des traitements médicamenteux. Par exemple, l'HTA est fréquemment associée au diabète, environ 50 % des diabétiques ont une HTA déclarée, constituant un facteur aggravant de toutes les complications. Dans le monde, plus d'un adulte sur trois souffre d'HTA et c'est la maladie chronique la plus fréquente en France. En absence de traitement, l'HTA peut entraîner des complications graves au niveau cardiovasculaire, cérébrovasculaire ou au niveau de certains organes cibles (rein, rétine ...), c'est la première cause évitable d'accident vasculaire en France.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'effet de nouveaux composés sur la pression artérielle (PA). Soit, dans le but d'analyser leur efficacité sur le traitement de l'HTA et de compléter ainsi l'arsenal thérapeutique disponible actuellement. Soit, afin de s'assurer de l'absence d'effet indésirable sur la PA d'un nouveau produit dédié à d'autres indications thérapeutiques.

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire dans ce contexte car aucun modèle *in vitro* ne permet d'étudier cette pathologie (remplacement) dont l'apparition est la résultante de la dérégulation de plusieurs mécanismes physiologiques.

Les effets des composés sont donc évalués en fonction de l'objectif de l'étude, soit sur un animal présentant des maladies cardiovasculaires et/ou métaboliques représentatif de la pathologie humaine (rat hypertendu et/ou diabétique) pour analyser une efficacité ; soit sur un animal

normotendu pour s'assurer de l'innocuité. Les composés à tester sont administrés chez l'animal et la PA est mesurée par la suite chez l'animal éveillé pour l'évaluation de leurs effets. La mesure de la PA se fait par la méthode de « tail-cuff », qui consiste à mesurer la PA sur animal vigile de manière non invasive au niveau de la queue de l'animal. Les composés qui seront analysés ont préalablement été étudiés *in vitro* et dont la cible thérapeutique suggère un effet sur la PA (réduction). Du fait des connaissances des procédures liées au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire au minimum (réduction) le nombre d'animaux inclus dans un groupe de traitement à n=12 pour réaliser des statistiques acceptables, soit un nombre total de rats de n=600 pour l'intégralité du projet sur 5 ans.

Les protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales seront suivis assidûment. Ensuite, un suivi quotidien de l'état général et du poids de l'animal sera réalisé dès la mise en place d'un traitement, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. Enfin, les rats seront hébergés par 2 par cage dès que possible et tant que le protocole le permet afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress, et un enrichissement adapté à leur espèce sera mis en place systématiquement (raffinement). Afin de compléter les données, des analyses biochimiques, de biologie moléculaire et histologique pourront être réalisées *ex vivo* à partir de sang, recueil d'urine ou d'organes prélevés chez les animaux.

14077 Les synapses du système nerveux central, organisées en réseaux, assurent la transmission des informations dans le cerveau. Les protéines dites « d'échafaudage » sont essentielles au maintien de la stabilité structurelle et de l'excitabilité des synapses. En particulier, la protéine Shank3 joue un rôle clef dans la stabilité synaptique, puisqu'elle permet de maintenir un grand nombre de protéines au niveau de la post-synapse. Il a été montré que des mutations de Shank3 chez l'Homme sont associées à des formes d'autisme. Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) représentent 2% de la population infantile et sont caractérisés entre autres par des déficits de l'intégration sensorielle. Les mécanismes exacts de ces troubles sont encore mal connus. Nous émettons l'hypothèse que le maintien de la stabilité synaptique est un élément clef pour l'intégration des informations sensorielles au niveau central. Etant donné l'importance de l'intégration des informations sensorielles dans les fonctions comportementales, des altérations de la réponse sensorielle pourraient engendrer d'autres symptômes du spectre de l'autisme.

Au laboratoire, nous disposons de plusieurs lignées de souris modèles d'autisme présentant des mutations de Shank3 (Shank3DC et Shank3Dex11). Nous allons réaliser des expériences de comportement couplées à des mesures de l'activité cérébrale (enregistrement des potentiels de champs locaux (LFP) et/ou des voies de signalisations avec un fibroscope) chez des souris contrôles, et des souris présentant des mutations de Shank3.

Le projet comporte 3 objectifs : 1/ caractérisation électrophysiologique de l'intégration des stimulus visuels et auditifs chez les modèles murins de Shank3, 2/ étude des voies de signalisation impliquées, grâce au fibroscope 3/ étude comportementale dans un paradigme de conditionnement à la peur associé aux stimuli sensoriels, couplée aux enregistrements électrophysiologiques et/ou optiques.

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux car elle adresse des mécanismes physiopathologiques complexes qui ne peuvent pas être récapitulés par des modèles plus simples (ex. culture de neurones). Néanmoins, nous essayons d'obtenir le maximum d'informations préliminaires par des analyses de modèles *in vitro* (ex. activité des virus sur culture cellulaire).

Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal : i) activité neuronale et comportement *in vivo* ; ii) rapporteurs d'activité post-mortem (ex. marquage c-fos) iii) contenu protéique de régions spécifiques du cerveau.

Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales qui garantissent le bien-être des animaux utilisés. Ainsi les animaux seront sous anesthésiés générale pendant les procédures expérimentales nécessitant une approche

chirurgicale et seront suivis quotidiennement en post-opératoire pour évaluation des signes de douleur. Des analgésiques seront administrés en cas de douleurs non sévère (activité réduite, fourrure ébouriffée) à persistante (activité réduite, fourrure ébouriffée, dos rond, aversion des congénères). Nous serons aussi attentifs aux signes d'infections, qui seront traités par antibiotique le cas échéant.

Nous estimons à 924 le nombre total de souris utilisé sur 5 ans.

14078 Le modèle expérimental de notre étude concerne la réparation du nerf péronier (une branche du nerf sciatique) chez le rat syngénique Fisher. Nos travaux consisteront à réparer le nerf péronier lésé (transsection) avec perte de substance de 3mm à l'aide d'une implantation veineuse (veine fémorale) et greffe ou non de cellules souches issues de la muqueuse olfactive. Deux paradigmes expérimentaux de réparation seront étudiés :

1) Implantation directe d'un fragment veineux calibré (veine fémorale) avec présence ou non de cellules souches olfactive.

2) Implantation différée d'un fragment veineux calibré (veine fémorale) avec présence ou non de cellules souches olfactive.

Objectif de l'étude.

L'objectif principal de cette étude sera, d'améliorer la repousse des axones moteurs et des afférences afin de conduire à une récupération sensori-motrice la plus complète. L'évaluation portera sur la récupération fonctionnelle, l'activité électrophysiologique, des études biomoléculaires et histologiques. A terme, ces résultats pourraient être transférés aux bénéfices des patients ayant subi des dommages nerveux périphériques (plaies, coupures, sections...).

Nombre d'animaux et espèce animale.

Tout au long de cette étude, des rats femelles adultes consanguins de souche Fisher seront utilisés. Ils seront répartis en 5 groupes. On compte 15 rats par groupe expérimentale (Groupe 2,3,4,5) et 8 rats pour le groupe control (Groupe 1). 8 rats mâles adultes consanguins de souche Fisher constitueront le groupe « donneurs » (Groupe 6) soit au total, 76 rats.

- Groupe 1 (n=8) : Rats sains servant de contrôle.

- Groupe 2 (n=15) : Suture différée avec interposition d'un fragment veineux calibré (veine fémorale) sans cellules souches olfactive.

- Groupe 3 (n=15) : Suture différée avec interposition d'un fragment veineux calibré (veine fémorale) avec greffe de cellules souches olfactive.

- Groupe 4 (n=15) : Suture directe avec interposition d'un fragment veineux calibré (veine fémorale) sans cellules souches olfactive.

- Groupe 5 (n=15) : Suture directe avec interposition d'un fragment veineux calibré (veine fémorale) avec greffe de cellules souches olfactive.

- Groupe 6 (n=8) : Prélèvement des muqueuses olfactives pour la culture cellulaire.

Remplacement.

Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'animaux pour réaliser notre étude. Les méthodes n'utilisant pas d'animaux livrent une quantité infime d'informations au regard de ce qui se passe dans un animal vivant entier. Notre projet vise à caractériser des résultats comportementaux, électrophysiologique, biomoléculaires et histologiques dans un contexte physiopathologique entier et c'est pour cela que l'utilisation d'animaux est absolument indispensable et nécessaire.

Réduction.

Le nombre de rats utilisés est réduit au minimum pour observer des différences statistiquement significatives malgré l'importante variabilité individuelle.

Raffinement.

Le rat est le modèle le plus opportun et le plus utilisé pour ce type d'expérimentations. Toutes les procédures chirurgicales seront exécutées par un personnel formé et expérimenté et se dérouleront

sous anesthésie gazeuses. Un analgésie per et post-opératoire sera apportée. Une surveillance quotidienne des animaux (les week end compris) : pesée, inspection des plaies chirurgicales et manipulation pour les habituer à l'expérimentateur.

Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies par des copeaux de bois et des dômes.

14079 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent principalement la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces maladies résultent d'une inflammation chronique d'une partie du tube digestif dont les causes, probablement multifactorielles, ne sont pas clairement connues.

La maladie de Crohn peut atteindre tous les segments du tube digestif, mais les atteintes sont généralement iléo-cæcales et segmentaires. Son évolution se fait le plus souvent par poussées séparées de périodes de rémission plus ou moins longues. Les symptômes les plus fréquents sont l'apparition de diarrhées avec présence de sang ou de glaires, des douleurs abdominales et une perte de poids accompagnée d'une détérioration de l'état général. La rectocolite hémorragique est également une pathologie inflammatoire chronique. Elle se distingue de la maladie de Crohn par la localisation exclusive des lésions au niveau du côlon. Les symptômes associent des selles fréquentes, des émissions de glaires sanglantes, des faux besoins et des douleurs abdominales. En France, la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique touchent chacune environ 1 personne sur 1000, soit plus de 100 000 cas en tout.

D'un point de vue thérapeutique, on distingue les traitements des poussées, visant à mettre le plus rapidement possible le tube digestif « au repos » des traitements d'entretien visant à maintenir le plus longtemps possible cette rémission. Différents types de traitements sont classiquement utilisés (salicylés, corticoïdes, immunosuppresseurs, antibiotiques, anticorps anti-TNF α) mais ils n'apportent pas à ce jour une réponse totalement satisfaisante, leur utilisation peut être accompagnée d'effets secondaires importants et ils ne sont pas efficaces chez tous les patients.

Compte tenu des éléments évoqués plus haut, il apparaît clairement que les efforts engagés pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant à la fois de mieux contrôler les poussées et d'en diminuer le nombre, doivent être poursuivis. Ces développements passent par la réalisation de tests effectués sur des modèles animaux aussi prédictifs que possible. Dans cette optique, le modèle par induction de dextran sulfate sodium (DSS) dans l'eau de boisson chez la souris a été développé depuis plusieurs années au sein de notre société et ce modèle a déjà été accepté par le comité d'éthique et le ministère depuis 5 ans. Le modèle d'inflammation colique par DSS est transitoire car réversible au bout de 10 jours et compte parmi les modèles les plus classiquement utilisés pour étudier l'efficacité d'un médicament et fait l'objet du présent projet.

Dans ce concept, les tests de candidats médicaments doivent être réalisés sur un organisme entier avant les tests réalisés en clinique (Remplacement).

Dans ce modèle murin, une inflammation intestinale rapide et contrôlée est induite associée à des symptômes semblables à ceux observés chez les patients atteints de MICI (Remplacement). Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est une estimation des projets à venir et a été déterminé par un calcul de $N = 75$ souris par série expérimentale. Chaque série se compose de 5 groupes : 1 groupe sain, 1 groupe porteur de la maladie traité au véhicule, 1 groupe porteur de la maladie traité avec le médicament de référence et 2 groupes porteurs de la maladie et traités avec le médicament à tester à 2 doses différentes. L'effectif de 15 souris maximum par groupe a été déterminé à partir de nos résultats antérieurs afin de permettre d'obtenir des données exploitables (Réduction). Une estimation basée sur notre expérience sur les 5 ans passés est la réalisation de 15 séries expérimentales sur 5 ans à venir, soit 1125 souris. Le point limite a été fixé sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance et par la bonne connaissance de ce modèle réalisé dans notre laboratoire depuis plusieurs années (Raffinement). En tenant compte de la réversibilité des symptômes, une attention particulière est apportée aux souris pendant les 10 jours qui suivent l'administration de DSS car une diarrhée et une perte de poids sont attendues et évaluées quotidiennement. Cependant, si une perte de poids supérieure à 20% était mesurée pendant plus de 48h (malgré les soins de nourrissage et de réhydratation), le point limite serait alors atteint et le

vétérinaire et/ou le porteur de projet procéderait à la mise à mort de l'animal selon la procédure en vigueur.

14080 Si les caractéristiques cliniques de l'état de stress post-traumatique (ESPT) sont bien décrites, les bases neurobiologiques de cette pathologie sont encore méconnues. L'une des caractéristiques de cette pathologie, qui se développe à la suite d'un événement de stress intense constituant un trauma, est une altération de la mémoire associant une amnésie pour le contexte précis dans lequel a eu lieu le trauma et une hypermnésie pour certains éléments de ce contexte. Ces caractéristiques comportementales pourraient être sous tendues par le dysfonctionnement d'une région cérébrale essentielle pour la mémoire, l'hippocampe. Or cette structure présente la particularité d'être le siège d'une neurogénèse continue (création de nouveaux neurones dans le cerveau adulte), phénomène très sensible au stress. Sur la base de ces observations, notre projet a pour but d'étudier l'implication de ce phénomène dans l'expression d'une mémoire pathologique suite à un trauma.

Pour le mener à bien, nous utiliserons un modèle animal qui reproduit les caractéristiques mnésiques observées chez les patients atteints de ESPT. Nous utiliserons pour ce projet un maximum de 720 souris issues d'un centre d'élevage agréé.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous avons défini un nombre maximum de souris par groupe qui correspond au nombre minimal nécessaire et suffisant pour faire des analyses statistiques cohérentes. Nous faisons également appel à du personnel expérimenté dans la réalisation des procédures chirurgicales, garantissant ainsi la réussite de ces procédures et donc une réduction du nombre d'animaux nécessaires. Dans un souci de Raffinement, les séquences comportementales seront organisées de façon à réduire au maximum l'inconfort des animaux et le personnel, formé, portera une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, de soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée au cours des étapes de chirurgie et de comportement, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur) sont utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales, et des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. Enfin par définition, ce projet, qui vise à mesurer les capacités mnésiques en situation de stress, ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus et le Remplacement animal n'est pas possible.

14081 Nous souhaitons évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps monoclonal dans un modèle préclinique de colite chez la souris NSG humanisée avec des cellules humaines CD34+. Ce modèle *in vivo* sera induit par une injection intra-rectale d'une solution composée d'éthanol 50% et d'acide 2,4,6-trinitrobenzensulfonique (TNBS).

Notre anticorps monoclonal a pour cible un récepteur membranaire exprimé sur les leucocytes humains, plusieurs travaux ont démontré que ce récepteur est associé aux pathologies inflammatoires et c'est un bon marqueur d'activation des lymphocytes T. Ce candidat médicamenteux a été généré et validé *in vitro*, néanmoins des tests *in vivo* sont nécessaires pour valider son potentiel thérapeutique.

Pour pouvoir envisager par la suite des essais cliniques nous devons tester *in vivo* cet anticorps dans le contexte d'une colite, ce qui est l'objectif de cette saisine.

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

- Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique, ces études *in vitro* ne peuvent pas remplacer les études *in vivo* vu la complexité du système immunitaire. Il est

donc nécessaire de tester l'efficacité thérapeutique de la molécule dans un modèle *in vivo* de colite proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

- Réduire : le potentiel thérapeutique de ces candidats médicamenteux sera étudié par le biais des tests statistiques. Le nombre de souris a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure de façon statistique quant aux résultats obtenus. Nous prévoyons deux parties : dans une première partie 120 souris avec 20 souris dans chaque groupe, et dans une deuxième partie un nombre de 120 souris (20 souris/groupe), c'est le nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 6 groupes (20 souris/groupe). Le nombre total d'animaux impliqué dans ce projet est de 240 (120 dans la première partie et 120 dans la deuxième partie)

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20 % de leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement (cf tableau annexe). Les conditions d'hébergement et d'enrichissement sont standards à l'espèce, les souris seront par groupe social de 5 maximum par cage ventilée sur un portoir à l'animalerie, avec des moyens d'enrichissement (des tunnels, et des bouts de papiers). Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids ainsi que le score clinique afin de diagnostiquer le développement de la maladie induite (colite). Des prélèvements sanguins seront effectués une fois tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines chez la souris NSG humanisée.

Tous les animaux traités avec les molécules et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'obtenir le maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction immunologique contre la colite, et par immuno-histologie pour étudier les conséquences de la migration des cellules humaines.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de cet anticorps testé sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de colite et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées versus souris contrôles. La validation de cette molécule dans ce modèle préclinique de colite chez la souris humanisée est une étape indispensable pour évaluer l'efficacité de ce traitement avant de passer aux tests cliniques

14082 Un régime gras et sucré ou la mise à jeun forcée chez la souris induit de nombreux désordres métaboliques tels que la modification du statut lipidique et la résistance à l'insuline. Pour évaluer ces désordres, deux tests sont couramment utilisés en laboratoire. Le premier test est le test de sensibilité à l'insuline et consiste à mesurer, dans le sang, la réponse hypoglycémique induite par l'injection d'une quantité connue d'insuline. Le deuxième test consiste à doser les acides gras et triglycérides plasmatiques.

Dans le cadre de travaux pratiques (TP) de Master 1, nous souhaitons confronter les étudiants à l'évaluation de ces paramètres classiques (sensibilité à l'insuline et dosages lipidiques) sur des souris adultes stabulées sous régime classique (non obésogène, non diabétogène) ou à jeun. Les résultats obtenus par les étudiants seront comparés à des résultats issus de la littérature obtenue sur des souris exposées à un régime obésogène et diabétogène pendant 2 mois. Ainsi, les étudiants pourront évaluer les conséquences physiologiques d'un régime gras et sucré chez la souris adulte. 80 souris adultes seront utilisées (mâles) sur la durée du projet (16 souris par an sur 5 ans).

Le test de sensibilité à l'insuline consiste à mesurer le taux de glucose plasmatique avant et après l'injection d'insuline. Ce test nécessite une restriction alimentaire de l'animal pendant 5 heures. Quatre prélèvements de sang, effectués par incision au bout de la queue seront réalisés au temps 0 min puis 15 min, 30 min et 60 min après injection intrapéritonéale d'insuline. Les souris seront mises à mort pour prélèvement d'organes. Pour cette analyse, 8 souris par séance de TP sont prévues.

Les dosages de lipides plasmatiques seront réalisés à partir de 100 µl de sang prélevé au bout de la queue sur souris nourries ad libitum. D'autre part, nous souhaitons évaluer l'impact du jeûne

alimentaire sur ce paramètre. Pour ces raisons, nous souhaitons prélever 24 heures plus tard 100 µl de sang sur ces mêmes souris mis à jeun la veille juste avant mise à mort pour prélèvement d'organes. Pour cette analyse, 8 souris par séance de TP sont prévues. Ces tests seront réalisés sur souris vigiles car l'anesthésie modifie l'homéostasie glucidique (hyperglycémiant) et lipidique altérant ainsi les résultats du test. Dans cette étude physiologique à visée pédagogique, seul le modèle *in vivo* permet d'évaluer ces paramètres métaboliques. Pour réduire le nombre d'animaux et limiter au maximum la souffrance de l'animal, nous avons choisi de ne pas imposer de régime obésogène et diabétogène à la souris. Pour ces raisons les étudiants confronteront leurs résultats à des données bibliographiques déjà publiées. Compte tenu du temps limité du TP (2 jours) et de la nécessité de la mise à jeun dans le cadre des deux tests, nous ne pourrions pas utiliser les mêmes souris pour le test de sensibilité à l'insuline et le dosage plasmatique. De manière à satisfaire les 3 R (réduction, raffinement et remplacement) nous avons choisi de ne pas imposer de régime obésogène et diabétogène à la souris et d'utiliser des données bibliographiques déjà publiées. D'autre part, toutes les précautions possibles (habituation, stabulation des animaux avec enrichissement ...) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort et la souffrance des animaux.

14083 La myxomatose (MYX) est une maladie majeure du lapin européen due au virus myxomateux. C'est une maladie encore très présente en France et à l'étranger, tant sur le lapin de garenne que sur les lapins d'élevage. Les pertes causées par cette maladie sont généralement très lourdes.

Il n'existe aucun traitement contre la myxomatose. La vaccination est la seule façon efficace de protéger un élevage, ou un lapin, contre la myxomatose. Deux formes de la maladie ont été décrites chez le lapin européen :

- la forme nodulaire (ou classique) : apparition de nodules (myxomes) sur les paupières, oreilles, parties génitales., abatement.
- forme respiratoire : suppuration des voies respiratoires, inflammation de la paupière, myxomes très réduits, abatement.

La maladie hémorragique virale (VHD ou viral hemorrhagic disease) dans sa forme classique a émergé en 1984 en Chine et est apparue en France durant l'été 1988. Il s'agit d'une hépatite virale du lapin sauvage ou domestique. La maladie est généralement septicémique et touche surtout des lapins adultes ou préadultes. La VHD est enzootique dans les populations de lapins sauvages d'Europe.

Il n'existe aucun traitement contre cette affection. Chez des lapins non vaccinés, cette hépatite virale dans sa forme classique (VHD-C) est habituellement responsable de 30 à 90 % de mortalité en région d'épizootie. Après une incubation de 2 à 5 jours, le lapin meurt.

Depuis 2010, un nouveau variant (nommé VHD variant 2010) formant un nouveau groupe génétiquement distant est apparu. Les mortalités enregistrées dans les élevages touchés par la VHD variant (VHD-V) varient entre 10 et 30%.

Dans les 2 formes de VHD la mort est parfois précédé de quelques signes cliniques : difficulté respiratoire, raideur des pattes postérieures, sang autour des narines ou de l'anus.

A ce jour il existe des vaccins contre ces 3 maladies, mais aucun vaccin ne permet la vaccination contre ces 3 pathologies d'un seul coup. Le projet présenté concerne le développement d'un vaccin, protégeant contre ces 3 pathologies. Le lapin est un animal assez sensible au stress, ce nouveau vaccin contribuerait à limiter le stress des lapins par la diminution de leur manipulation pour les vaccinations.

Dans le cadre de ce développement, des essais sur l'espèce cible du vaccin (sensible à la myxomatose et la VHD), le lapin, doivent être menés afin d'évaluer l'innocuité du vaccin ainsi que son efficacité. Tous les essais sur lapins prévus dans le cadre ce projet sont encadrés réglementairement et constituent des pièces du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) nécessaires à la commercialisation du vaccin.

La pharmacopée impose la recherche d'agents étrangers dans chaque lot de vaccin (test libérateur) afin d'en vérifier la pureté. L'essai indiqué par la pharmacopée est une recherche indirecte sur lapins (recherche d'anticorps). Cette recherche sera remplacée par une recherche directe (par le biais de techniques moléculaires) des agents étrangers spécifiés n'impliquant plus le recours à l'animal. Par ce biais, l'utilisation des lapins sera exclusivement limitée à la phase de développement du vaccin.

Le nombre maximal de lapins nécessaires au projet de développement (essais cliniques et essais préparatoires) est estimé à 1055 lapins. Le nombre de lapins à inclure dans chaque type d'essai (ou procédure) est fixé par la pharmacopée européenne. En nous appuyant sur des données expérimentales antérieures, il est prévu de cibler au mieux les essais préparatoires afin de limiter le nombre de lapins à inclure.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;

- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;

- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;

- Manipulation des lapins dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;

- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai ;

- Mise en place d'une procédure d'évaluation des points limites spécifiques de la myxomatose et de la VHD permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.

14084 Les maladies neurodégénératives constituent un problème de santé majeur en raison de leur fréquence et de leur gravité (maladies chroniques irréversibles). Parmi ces maladies, nombre d'entre elles sont dues à une agrégation de protéines mal repliées ou mal dégradées, entraînant la mort des neurones. C'est le cas en particulier des synucléinopathies, caractérisées par l'accumulation anormale d'agrégats toxiques de protéine α -synucléine dans les cellules cérébrales. La maladie de Parkinson est l'exemple le plus connu de ce type de pathologie, mais les synucléinopathies regroupent également la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée. En plus de leur perte de fonction initiale liée à leur mauvais repliement, ces protéines acquièrent des fonctions toxiques, en particulier celle de recruter et d'agréger les protéines solubles, ayant pour conséquence de permettre le transport dans l'organisme de ces agrégats et d'amplifier le phénomène de toxicité par propagation. A ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de traiter ces maladies ni même de ralentir la propagation des agrégats. Comprendre les mécanismes de propagation des agrégats d' α -synucléine et les voies majoritairement empruntées pour leur dispersion à travers les tissus cérébraux est une étape préalable à la mise en œuvre de traitements curatifs. Pour cela, il est particulièrement important de disposer d'un outil permettant de détecter *in vivo* les agrégats d' α -synucléine et de suivre leur devenir au cours du temps.

Parmi toutes les modalités d'imagerie permettant d'étudier de manière non invasive les maladies neurodégénératives, l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est l'une des plus prometteuses compte tenu de sa capacité à fournir des images haute résolution du cerveau, permettant ainsi une mesure précise des altérations des structures cérébrales telles que la substance noire, le tronc cérébral, les noyaux gris centraux ou le cortex. De plus, une méthode d'IRM innovante a été développée dans le laboratoire et permet de détecter les agrégats d' α -synucléine de façon non-invasive. Dans ce projet, cette technique sera utilisée afin de détecter les agrégats d' α -synucléine dans le cerveau de modèles murins et suivre leur propagation au cours du temps. Cela permettra à terme d'offrir un outil de diagnostic permettant d'identifier le stade de développement de la maladie et de son extension dans le cerveau. Cet outil pourra également être utilisé pour évaluer l'efficacité

des futurs traitements. Enfin, cet outil de diagnostic pourrait être facilement transférable à des études cliniques incluant des patients atteints de la maladie de Parkinson.

Le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet car aucun milieu de culture ou simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du fonctionnement du cerveau. De plus, l'utilisation de souris permet d'étudier précisément les processus d'agrégation dans le cerveau grâce à l'utilisation d'IRM à des champs magnétiques plus élevés que ceux utilisés en clinique.

Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet, sont nés et élevés en captivité. Ils proviennent d'un élevage autorisé (souris de souche sauvage). Le projet prévoit l'utilisation d'un total de 30 souris. Ce nombre maximum a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et des différents groupes expérimentaux requis pour pouvoir répondre à notre question scientifique.

Les examens IRM sont effectués sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés au système de positionnement de l'animal qui diminuerait le bien-être des animaux. L'injection de la protéine α -synucléine sera faite par chirurgie dans le cerveau des animaux suivant un protocole prenant en charge l'analgésie et l'anesthésie mis au point à l'aide du vétérinaire.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de la procédure chirurgicale ainsi que durant l'examen IRM et pendant toute la phase de réveil. Le suivi quotidien et l'application de critères d'arrêt de l'expérience sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus qui compromettraient le bien-être des animaux.

14085 L'objectif de cette étude chronique chez la brebis est de tester l'effet protecteur d'une nouvelle molécule (OP2113) sur les conséquences d'un infarctus du myocarde. Cette molécule possède des propriétés qui en font un candidat potentiel pour limiter les dommages cellulaires induits à la suite d'un infarctus au moment de la prise en charge médicale pour rétablir le flux sanguin. Nous nous proposons d'étudier les effets de l'OP2113 sur un modèle d'infarctus myocardique induit artificiellement chez la Brebis par obstruction temporaire (60 min) d'une artère coronaire, mimant les conditions d'un infarctus créé par un caillot sanguin chez l'homme. Ce modèle sera utilisé pour évaluer l'efficacité à 3 mois d'une perfusion en continu du produit OP2113 pendant 3 jours après l'infarctus sur la préservation des tissus cardiaques et la fonction contractile. De par son analogie avec la physiologie cardiaque humaine, ce modèle devrait permettre de définir les modalités d'utilisation de la molécule (concentration, mode d'administration, ...) en vue des tout prochains essais cliniques. Dans ce cadre, il n'est donc pas possible de remplacer le modèle et l'utilisation d'animaux. Le REMPLACEMENT du modèle n'est pas envisageable dans le cadre de l'objectif du projet qui est une étude pré-clinique, étape nécessaire avant de pouvoir réaliser une étude chez l'Homme.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, la REDUCTION du nombre d'animaux a été mis en place, ainsi le nombre total d'animaux prévu pour cette étude a été réduit au minimum, le nombre prévu de brebis inclus est de 35 : 5 animaux pour l'étude de faisabilité, puis 2 groupes de 15 animaux (véhicule et OP2113). Malgré un taux de mortalité prévisible en raison de la gravité des infarctus, ce nombre devrait être suffisant pour l'analyse statistique.

Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures :

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

14086 CONTEXTE : Le changement climatique modifie les conditions océaniques. Non seulement la température de l'eau augmente progressivement, l'eau s'acidifie, mais les animaux marins subissent également des épisodes de faible disponibilité en oxygène dans l'eau (hypoxie). Il a été largement démontré que l'hypoxie peut menacer la capacité d'un animal à maintenir son équilibre énergétique cellulaire. La mitochondrie, organe présent par milliers dans les cellules animales, joue le rôle de centrale énergétique des cellules : à partir de l'oxygène que l'on respire, les mitochondries convertissent les nutriments en une forme d'énergie utilisable par les cellules, l'ATP (l'adénosine triphosphate). Chez les Humains, il a été démontré que les individus vivants en haute altitude se portent bien, et ce malgré une pression partielle en oxygène relativement faible. Ceci s'explique en partie grâce à des mitochondries plus efficaces. Une variabilité intraspécifique est aussi reconnue chez les poissons, où certains individus peuvent nager, se nourrir et grandir dans des conditions hypoxiques plus sévères que d'autres. Les différences d'efficacité mitochondriale entre poissons maintenus en normoxie permettent aux individus plus efficaces de grandir plus vite. Cependant, nous ne savons pas si cette relation est maintenue en condition hypoxique. La variabilité interindividuelle de l'efficacité mitochondriale pourrait jouer un rôle clé dans la persistance des populations et des espèces face aux conditions d'hypoxies.

PROJET : Les enjeux de ce projet sont principalement:

è Développer une méthode non-létale, la biopsie, pour prélever des muscles de poissons et y mesurer le fonctionnement des mitochondries.

è Valider la stabilité temporelle du fonctionnement des mitochondries de muscle rouge.

è Déterminer expérimentalement chez un poisson le rôle de l'efficacité mitochondriale face aux changements environnementaux tels que l'hypoxie.

Le modèle poisson utilisé est le bar Européen. Cette espèce a été choisie car elle a un fort intérêt halieutique en Europe et qu'elle rencontre naturellement des périodes hypoxiques qui pourraient la rendre vulnérable. Ce modèle présente aussi l'intérêt de pouvoir être maintenu en laboratoire, permettant ainsi de développer une méthode de prélèvement non-létale associée à une surveillance rapprochée des animaux.

Le nombre total de bar utilisés dans ce projet est de 600.

Le projet comprend 4 procédures différentes :

- Procédure 1 - Marquage individuel des poissons par insertion de puce électronique.
- Procédure 2 – Biopsie de muscle rouge.
- Procédure 3 – Test de nage.
- Procédure 4 – Tolérance à l'hypoxie.

Les 600 poissons seront marqués, puis utilisés lors des procédures Biopsie (n = 100), Test de nage (n = 80), Tolérance à l'hypoxie (n = 400), ou encore comme individus contrôles (n=20). Aucun individu ne subira plus de 2 procédures différentes.

PRINCIPES ETHIQUES : Ce projet a été construit en respectant la règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

Remplacement: A ce jour, seule l'expérimentation animale permet de réaliser une étude qui englobe l'ensemble de l'organisme et ses réponses physiologiques. Cela permet notamment de caractériser le résultat d'interactions complexes entre différents tissus et fonctions cellulaires, offrant ainsi la possibilité d'avoir un suivi complet des réponses mitochondriales face à l'environnement de l'animal.

Réduction : le nombre de poissons a été réduit au minimum et défini au seuil de la pertinence scientifique et statistique, compte tenu de l'étendue de la variabilité interindividuelle des processus étudiés dans cette étude. Le suivi temporel du fonctionnement mitochondrial permettra à terme de diminuer le nombre d'individus, où chaque individu deviendra son propre control.

Raffinement : L'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des poissons tout au long des projets en mesurant la prise de poids de chaque individu avant et après une procédure. Lors des procédures Marquage des poissons et Biopsie, les poissons seront anesthésiés. Pour le test hypoxique et le test de nage, les animaux seront en surveillance permanente. Ils seront retirés de

la procédure dès que le point limite sera atteint. Afin de favoriser une récupération rapide de la biopsie, une incision de la peau permettra au punch à biopsie d'attendre le muscle rouge sans enlever de peau au poisson. De la colle chirurgicale sera appliquée sur l'incision ce qui favorisera une cicatrisation cutanée.

Ce travail a des implications majeures dans la compréhension des réponses physiologiques mises en place par les animaux marins et dans la prédiction de leurs capacités – ou incapacité – à faire face aux changements océaniques futurs. L'efficacité mitochondriale (génétiquement déterminée et héréditaire) pourrait contraindre les animaux marins les moins efficaces à être « éliminés » par les stress environnementaux auxquels ils sont confrontés. Cependant, à ce jour, les effets des stress environnementaux sur le fonctionnement des mitochondries n'ont été abordés qu'indirectement en raison de la nature des méthodes disponibles : les méthodes d'analyses sont létales. A terme, ce travail pourrait permettre de développer une nouvelle méthode d'évaluation de l'état de santé des poissons sauvages basée sur le phénotype mitochondrial mesuré à partir d'une biopsie de poisson.

14087 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

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

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

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

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur hors période post-opératoire. Les

rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification pour les rongeurs, jouets pour les porcins/chiens et chainette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

14088 L'encéphalopathie hypoxique-ischémique néonatale (EHI) est une affection du cerveau due à une diminution de l'apport en oxygène. Elle fait suite à une asphyxie à la naissance et est une cause majeure de décès ou d'invalidité à long terme chez les nouveau-nés nés à terme. Elle affecte 1 à 4 décès pour 1 000 naissances vivantes et par conséquent 30 000 nourrissons / an en Europe. L'incidence et les conséquences de l'EHI sont encore plus courantes et graves dans les milieux défavorisés, touchant environ 1 million de nourrissons chaque année dans le monde.

Au cours des dernières années, l'hypothermie thérapeutique est devenue la norme de soins pour améliorer le devenir des bébés après des lésions hypoxiques-ischémiques périnatales. Mais, malgré l'hypothermie et les soins intensifs néonataux les plus modernes, 45 à 50% des enfants atteints d'EHI modérée ou grave meurent ou souffrent d'une déficience neurodéveloppementale à long terme.

Par conséquent, une optimisation précoce supplémentaire des soins périnataux en plus de l'hypothermie est nécessaire afin d'améliorer la prise en charge de l'EHI.

C'est pourquoi nous aimerions utiliser un modèle d'EHI chez le raton afin de tester une nouvelle stratégie de protection. Ce modèle, utilisé dans de nombreuses études scientifiques, induit des lésions cérébrales similaires à celles retrouvées chez les nourrissons humains touchés par une EHI.

Afin de potentialiser les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie, nous aimerions la coupler avec l'injection dans le péritoine (injection intrapéritonéale) d'une molécule qui a une action bénéfique sur ce modèle par la modulation du débit sanguin cérébral.

Notre protocole sera le suivant : induire les lésions cérébrales sous anesthésie par ligature d'une carotide (ischémie) puis mise de l'animal sous 8% d'oxygène pendant 2h (hypoxie).

Un traitement sur animal vigile sera ensuite dispensé à une partie des animaux : hypothermie (abaissement de la température corporelle en dessous de 33°C grâce à l'utilisation d'un caisson mis dans un bain marie) + injection intrapéritonéale de la molécule.

Nous désirons ensuite comparer les lésions cérébrales des animaux qui n'ont pas reçu de traitement à ceux ayant subi le traitement.

Les animaux seront utilisés à 10 jours de vie, et euthanasiés à 13 et 17 jours de vie afin d'analyser leur cerveau.

Nombre d'animaux utilisés : il est prévu d'utiliser 198 ratons. Nous désirons mener le projet sur 3 ans.

Afin de respecter la règle des 3 R notre projet comprend :

- remplacer : désirant étudier le développement cérébral général, il est impossible de remplacer les expérimentations *in vivo* de cette étude par des expérimentations alternatives. En effet, le tissu cérébral est extrêmement complexe et de nombreuses cellules différentes sont en interaction lors de son développement. Il n'existe pas de modèles *in-vitro* ou d'organoïdes suffisamment représentatifs pour le développement cérébral.

- réduire : pour utiliser le nombre d'animaux juste pour cette étude nous nous sommes basés sur les résultats des études antérieures sur ce modèle. Il s'avère que la quantité de 12 animaux / groupe est la quantité adéquate pour nos analyses. Une fois les données relevées, des tests statistiques sont prévus pour la comparaison des différents groupes.

- raffiner : Les animaux seront suivis durant tout le processus opératoire : utilisation d'un tapis chauffant, vérification de leur température corporelle, vérification de l'acceptation lors de la remise à la mère. Des critères d'arrêt ont été définis et seront utilisés, entraînant l'euthanasie de l'animal s'ils sont atteints. L'ensemble des animaux sera suivi par le personnel qualifié de l'animalerie, avec attention à la croissance et à l'aspect des rats tout au long de l'étude. La surveillance est effectuée chaque jour weekend compris.

14089 L'immunociblage de tumeurs à l'aide d'anticorps monoclonaux est une option thérapeutique qui a émergé il y a une quinzaine d'année. Actuellement 50 anticorps médicaments sont sur le marché (dont la moitié est utilisée dans le cancer), et plusieurs centaines d'anticorps sont en essai clinique en oncologie thérapeutique. Dans l'optique de développer de nouveaux médicaments, notre laboratoire développe des anticorps humains à visés thérapeutiques contre des cibles membranaires surexprimées dans les cancers. Pour valider leurs capacités à inhiber la croissance des cellules tumorales nous implantons sur des souris immunodéficientes des cellules de tumeurs humaines. Une fois la tumeur établie, nous traitons les souris porteuses de tumeurs humaines avec nos anticorps spécifiques ainsi qu'avec un anticorps irrelevant comme témoin négatif ou un anticorps ou chimiothérapies validés en thérapie clinique, qui nous servent de contrôles positifs. En mesurant le volume tumoral nous pouvons alors déterminer si les anticorps développés au laboratoire ont une action anti-tumorale qui pourrait un jour être mis en place pour une thérapeutique clinique.

Pour étudier l'impact de nos anticorps sur des cancers d'origine humaine, il est indispensable d'utiliser des animaux immunodéprimés qui "acceptent" des xénogreffes. Il n'existe pas à ce jour d'autres moyens que l'expérimentation animale pour étudier l'action d'anticorps (notamment l'impact du stroma, l'activation ou l'inhibition du système immunitaire) contre des cellules tumorales.

Dans le but d'appliquer la règle des 3R, seuls ne sont injectés aux souris que les anticorps ayant passés une validation stringente de leur activité anti-tumorale *in vitro* afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ces derniers font l'objet d'une surveillance régulière et leur milieu est enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Au total sur les 5 ans du projet, le nombre maximal de souris utilisées sera de 750 souris.

14090 Les hormones thyroïdiennes influencent le développement de tous les mammifères, dont l'Homme. Notre groupe s'intéresse en particulier aux rôles joués par les hormones thyroïdiennes (HT) dans le développement du cerveau, notamment sur la neurogenèse tout au long de la vie. La neurogenèse implique une coordination étroite entre les mécanismes qui gouvernent la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (CSN), localisées dans des régions précises du cerveau des vertébrés.

Nous utilisons le modèle souris (*Mus musculus*) pour nos expériences. La neurogenèse a été bien caractérisée au niveau d'une niche neurogénique clé, la zone sous-ventriculaire (SVZ) à partir de laquelle sont générés de nouveaux (i) neurones nécessaires à la fonction olfactive des rongeurs et (ii) cellules gliales qui protègent les axones et accélèrent la propagation du message nerveux. Ces dernières années, nous avons caractérisé *in vivo* l'impact des HT sur la zone sous-ventriculaire (SVZ) chez la souris adulte. Notre projet actuel vise à étendre nos connaissances sur l'influence des HT lors du développement, en particulier dans les premières semaines de vie de la souris. En effet, il est bien établi qu'un pic en HT se produit chez les rongeurs dans les trois premières semaines post-natales. Notre hypothèse est que ce pic en HT détermine la capacité des CSN à générer de nouveaux neurones et/ou cellules gliales chez les souris et conditionne à long terme les capacités neurogéniques/gliogéniques des CSN chez la souris adulte. D'autre part, notre groupe s'intéresse aux effets adverses des polluants environnementaux qui interagissent en particulier avec la signalisation thyroïdienne. En effet, il est désormais bien admis que ces perturbateurs endocriniens - auxquels nous sommes tous exposés et ce, dès les stades précoces de la gestation - modifie notamment le développement cérébral et les capacités cognitives de la descendance. Notre projet vise ainsi à comprendre chez la souris comment ces polluants - via leur action sur les

HT au cours du développement - altère à court et à long terme la capacité des CSN à générer des neurones et/ou des oligodendrocytes.

Les effets d'un hypothyroïdisme (procédure 1) et d'une exposition aux polluants chimiques (procédure 2) seront étudiés sur une lignée de référence (C57BL/B6), la plus utilisée par les laboratoires de recherche. Les souriceaux utilisés seront âgés de 4, 8, 15 et 21 jours après la naissance. Les procédures seront appliquées dans le respect du bien-être animal et par un personnel spécifiquement formé. Les deux procédures envisagées sont estimées de classe légère. Les animaux seront étroitement surveillés lors leur croissance et ce, dès leur naissance jusqu'au jour du sacrifice. Des pesées hebdomadaires permettront d'évaluer la croissance des souriceaux. Notons que si les souriceaux et/ou les femelles gestantes présentent des signes de stress (perte de poids, prostration, pelage altéré), le projet sera immédiatement stoppé et les objectifs initialement prévus du projet seront réévalués.

Par ailleurs, les souris seront hébergées dans des conditions optimales : les mères gestantes et leurs petits seront isolés (une mère gestante par cage). La surface des cages sera au minimum égale aux recommandations en vigueur, avec eau et nourriture ad libitum. Des igloos, bâtons de bois et ouate seront disposés dans chaque cage afin que la mère construise notamment son nid.

Le nombre d'animaux utilisés sera limité autant que possible, dans la limite des contraintes imposées par les analyses statistiques. Sur une durée de projet fixée à 3 ans, nous estimons que – sur l'ensemble des deux procédures mises en place - le nombre maximum de femelles gestantes nécessaires est de 144 et le nombre de nouveaux nés de 1152. Les souriceaux mâles et femelles seront indifféremment utilisés dans la présente étude. Des analyses histologiques, moléculaires ainsi que des prélèvements de sang seront réalisés post-mortem. Les prélèvements de sang et de tissus (cerveau) seront réalisés en parallèle sur le même animal et ce, dans un souci de réduction du nombre d'animaux sacrifiés.

14091 Le développement et la bonne caractérisation des modèles animaux expérimentaux de pathologies humaines constituent des étapes incontournables et indispensables pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons aux mécanismes conduisant à la perte des cellules neuronales lors de maladies du système nerveux central appelées synucléinopathies. Celles-ci sont caractérisées par la présence de dépôts fibrillaires d'une protéine appelée l'alpha-synucléine (ASYN). Il existe trois principaux types de synucléinopathies : la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée.

Pour ce projet, le recours aux modèles animaux est nécessaire, car aucun milieu de culture *in vitro* ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules. Le développement de modèles animaux reproduisant le mieux possible les caractéristiques de la pathologie humaine sont nécessaires pour pouvoir envisager de tester l'efficacité de nouvelles pistes thérapeutiques dans cette maladie.

Dans ce projet, il s'agit de créer de nouveaux modèles murins alliant les deux composantes principales de la maladie de Parkinson, à savoir : l'agrégation de la protéine alpha-synucléine et l'atteinte préférentielle des neurones dopaminergiques de la substance noire (structure cérébrale) impliquée dans l'apparition des troubles moteurs dans cette maladie. Les études seront envisagées sur des souris transgéniques dites « humanisées » exprimant exclusivement le gène humain de la protéine alpha-synucléine. Ce modèle est donc plus pertinent pour appréhender les mécanismes de la neurodégénérescence dans cette pathologie.

Le projet se décompose en trois parties. Dans un premier temps, nous chercherons à étudier la sensibilité des souris transgéniques humanisées pour l'alpha-synucléine à l'exposition au 1-méthyl-4-phényl-1,2, 3, 6-tétrahydropyridine (MPTP), une neurotoxine reconnue comme modèle toxique de la maladie de Parkinson. Nous chercherons ensuite à induire expérimentalement la surexpression de l'alpha-synucléine mutée (responsable des formes familiales de la maladie de Parkinson) chez ces souris. Cette surexpression sera induite par l'injection intracérébrale de vecteurs viraux

permettant l'expression de la protéine humaine mutée directement au niveau de la substance noire. Les animaux seront alors évalués sur le plan comportemental pour voir si cette surexpression entraîne l'apparition de troubles moteurs associés à une atteinte spécifique des structures cérébrales impliquées dans la maladie humaine. Enfin, dans un troisième temps, nous regarderons si la surexpression d'alpha-synucléine mutée modifie la sensibilité à l'exposition au MPTP chez ces animaux et permet d'observer des atteintes comportementales et histopathologiques plus prononcées et également plus proches de celles rencontrées chez l'Homme. L'objectif de ce projet est donc de mettre au point le modèle le plus pertinent pour tester des approches thérapeutiques variées sur tous les aspects de la maladie humaine.

Le projet prévoit l'utilisation d'un total de 120 souris sur les 5 ans du projet. Les animaux seront surveillés quotidiennement et l'application de critères d'arrêts permettra de veiller au bien-être des animaux. Les animaux seront hébergés en groupe, en milieu enrichi, avec accès à l'eau et à la nourriture de façon *ad libitum*. Les chirurgies intracérébrales de particules virales et les administrations répétées de MPTP seront réalisées par des personnes compétentes pour ces gestes techniques. La surveillance des animaux par les personnes en charge du projet sera accrue durant la phase d'exposition au MPTP qui est la période la plus critique dans ce projet. Nous veillerons aussi à faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau pour les animaux durant cette période.

Ce projet s'inscrit dans une démarche de recherche « transrationnelle ». Il permettra, à terme, d'utiliser ces modèles expérimentaux pour valider de nouvelles stratégies thérapeutiques et ainsi améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients atteints de la maladie de Parkinson ou autres synucléinopathies en permettant : l'aide au diagnostic et la prévention de l'apparition de processus neurodégénératifs, mais également l'évaluation précise de l'effet thérapeutique de candidats « médicament ».

14092 Le développement d'un modèle animal pertinent et prévisible de la maladie de Parkinson (MP) est un besoin non satisfait pour la communauté de recherche afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la pathologie et pour l'identification et la validation de stratégies thérapeutiques.

Dans ce projet, nous étudierons un modèle de rat dont le gène d'intérêt sera invalidé et en effectuant une caractérisation / validation longitudinale complète de la neuropathologie dans ce nouveau modèle animal de MP. Non seulement cette approche sera utile pour modéliser la MP, mais sa nature polyvalente permettra le développement de modèles imitant d'autres troubles neurodégénératifs dévastateurs qui partagent des caractéristiques communes avec les maladies de surcharge lysosomale. Ce nouveau modèle animal qui sera caractérisé en profondeur offrira de nouvelles perspectives dans la pathogenèse de la MP et sera un outil puissant pour tester et valider des approches thérapeutiques.

Pour chaque état et à chaque génération nous assurerons un suivi rigoureux des animaux de leur naissance à leur mort, afin de garantir que le modèle dispose des caractéristiques propres au développement de la MP mais que le développement de ces événements n'est pas néfaste au Bien-être animal (BEA). Dans le cas contraire, nous mettrons en oeuvre l'ensemble des soins et limiterons la souffrance et le mal être à leur minimum en établissant des points limites stricts.

Pour ce faire 4 « sous-lignées » indépendantes seront suivies. Des individus de chaque sous-clone seront analysés après sacrifice afin de ne sélectionner que la colonie développant les symptômes de la MP.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de déterminer que le nombre de rats nécessaires à l'analyse postmortem est de 96.

Le remplacement est impossible pour ces expériences qui ont pour but de caractériser un nouveau modèle *in vivo*.

Une attention particulière pour le raffinement de notre procédure de perfusion sera apportée pour limiter douleur et stress des animaux.

Enfin, nous leur fournirons les meilleures conditions de vie tout au long du projet puisque le bien-être des animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort.

14093 Le but de ce projet est de caractériser des biomarqueurs sanguins de la croissance osseuse pour le suivi d'efficacité d'un traitement pour l'achondroplasie, qui est la forme de nanisme la plus fréquente chez l'Homme. Cette maladie est due à des mutations du gène du récepteur 3 du facteur de croissance fibroblastique (FGFR3) encodant un récepteur transmembranaire important, entre autres dans la régulation de la croissance linéaire des os longs. Nous avons montré précédemment l'efficacité d'un traitement par protéine recombinante dans un modèle de souris achondroplasies mimant cette pathologie.

Nous utiliserons dans ce projet des souris qui présentent la même pathologie que celle exprimée chez l'homme. Il s'agit d'une souche à phénotype dommageable (troubles de la locomotion, paralysie unilatérale, paralysie bilatérale avec atteinte de la vessie, troubles respiratoires). Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux afin d'identifier des biomarqueurs d'efficacité et de transposer leur utilisation chez l'Homme, et ainsi continuer le développement pré-clinique d'une molécule d'intérêt. Les projets précédents ont permis de sélectionner une molécule de référence qui a démontré son efficacité sur la croissance de souris nouveau-nées, et aussi de choisir les biomarqueurs sanguins pour le suivi d'efficacité du traitement. Ce projet a comme objectif de tester plusieurs candidats optimisés de la molécule de référence pour continuer leur développement. Les résultats de ce projet permettront de transposer l'utilisation de ce traitement de façon plus adéquate chez l'enfant.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie. Ce potentiel traitement permettrait de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications liées à cette pathologie, notamment les paralysies de la moelle épinière.

Afin de satisfaire aux exigences de la règle des 3R, nous avons mis en place différentes stratégies pour ce projet. Tout d'abord dans un but de remplacement nous avons choisi les molécules optimisées après avoir réalisé des expériences sur cellules afin de ne tester chez l'animal que les molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé. Dans un but de réduction, nous allons randomiser la distribution des animaux par groupe selon leur poids ou leur génotype, il y a en effet une corrélation directe entre poids et génotype avant le traitement pour réduire considérablement le nombre d'animaux à utiliser. Enfin dans un but de raffinement des expériences nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux au cours des procédures expérimentales grâce à des grilles de suivis et l'établissement de points limites précoces. Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (igloos, briques de bois à grignoter, buchettes, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée.

Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 3664 souris soit 904 souris dans la procédure 1, 960 souris dans la procédure 2, 720 souris dans la procédure 3, et 1080 souris dans la procédure 4 sur une période de 5 ans.

14094 Le glaucome est une des principales causes de perte irréversible de la vue. Cette maladie de l'œil est fréquente et touche principalement les personnes de plus de 45 ans. En France on estime le nombre de personnes atteintes à 1 million et les projections prévoient une augmentation de l'incidence en 2020 avec plus de 80 millions de personnes touchées à travers le monde. La perte de la vue est causée par une dégénérescence progressive des fibres nerveuses du nerf optique et par la mort des neurones de la rétine qui projettent ces fibres jusque dans le cerveau. Le plus souvent le glaucome est associé à une augmentation de la pression à l'intérieur de l'œil qui endommage les fibres nerveuses. La plupart des traitements existants visent à diminuer la pression intraoculaire. Cependant même avec ces traitements, près de 30% des personnes développent une

cécité. De plus, près d'un tiers des patients développent un glaucome alors que la pression intraoculaire est normale. Ainsi le développement de nouveaux traitements efficaces pour le glaucome est un enjeu de santé publique majeur.

Dans le laboratoire nous avons identifié de nouvelles biomolécules capables de protéger les neurones de la mort cellulaire et d'induire la régénérescence de leurs fibres nerveuses. Ces molécules pourraient donc être extrêmement bénéfiques dans le glaucome pour préserver ou restaurer la vision. Nous avons déjà mis en évidence les propriétés neuroprotectrices et neurorégénératrices de ces molécules *in vitro* sur des cultures de neurones. Nous souhaitons maintenant démontrer leur efficacité dans un modèle de glaucome chez la souris, étape préalable avant le développement de ces molécules pour des essais cliniques.

Le modèle de glaucome que nous utiliserons sera obtenu par pincement intra-orbital calibré du nerf optique de souris qui provoque une dégénérescence des fibres du nerf optique et des neurones de la rétine. Il s'agit d'un modèle de glaucome reconnu et très utilisé. Les biomolécules à tester seront délivrées au niveau de la rétine par une injection intraoculaire. Les animaux seront mis à morts entre 2 et 6 semaines après le pincement du nerf afin d'évaluer l'effet des biomolécules sur la préservation des neurones de la rétine et sur la régénérescence des fibres nerveuses dans le nerf optique. Le pincement du nerf sera unilatéral afin de préserver les fonctions visuelles de l'animal. Les souris dont le nerf optique aura été pincé recevront des injections d'analgésiques. Elles seront suivies tout au long de la procédure et mises à mort en cas de dépassement des points limites définis dans ce projet.

Pour ce projet, un maximum de 1086 souris (mâles et femelles de 9 semaines) réparties dans 6 procédures (306 souris dans 2 procédures de gravité légère et 780 dans 4 procédures de gravité modérée) sera nécessaire. Nous avons choisi le modèle souris pour sa taille et son anatomie, particulièrement adaptées à la chirurgie ophtalmique. De plus, une lignée de souris transgénique existante sera utilisée dans certaines procédures. Ce nombre de souris devrait nous permettre de tester l'efficacité de 8 biomolécules différentes et a été calculé à l'aide de tests de puissance statistique en prenant en compte nos résultats antérieurs. Dans un souci de remplacement, les biomolécules testées chez l'animal auront au préalable été sélectionnées par des tests *in vitro* sur cultures neuronales pour leur absence de toxicité et leur efficacité en termes de neuroprotection et de neurorégénération. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire, seule la biomolécule la plus efficace et la moins toxique dans les procédures 1 et 2 sera testée dans les procédures suivantes. Les souris seront hébergées par groupe de 6 individus et leur environnement sera enrichi de matériaux de nidification. Leur état général sera suivi régulièrement et en cas d'atteinte d'un des points limites définis dans ce projet, l'animal sera mis à mort.

Ce projet de recherche translationnel est une étape clé dans la validation et le développement de nouveaux médicaments pour traiter le glaucome.

14095 La leucémie aigüe promyélocytaire (LAP), cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang, est déclenchée par une anomalie génétique menant à un gène anormal formé de la fusion de deux gènes normaux particuliers. La protéine chimérique qui en résulte est nécessaire et suffisante pour déclencher la leucémie. Deux agents thérapeutiques découverts par hasard, l'acide rétinoïque et l'arsenic se fixent directement à cette protéine chimérique, changeant profondément ses fonctions biologiques et induisant finalement sa destruction. En utilisant des approches pharmacologiques et génétiques, nous avons formellement démontré que la dégradation de cette protéine est bien responsable de l'éradication définitive de la maladie par la combinaison acide rétinoïque/arsenic *in vivo*. Nous cherchons maintenant à caractériser les événements en amont et en aval de cette dégradation et de la reformation de structures subcellulaires organisées par l'une des deux protéines normales impliquée dans la fusion, afin d'identifier des mécanismes qui pourraient être activés dans d'autres types de tumeurs. Les résultats obtenus jusqu'à présent laissent à penser que la protéine normale elle-même joue un rôle dans la réponse au traitement de la LAP, entre autres via sa sensibilité au stress oxydant (l'arsenic étant un puissant agent oxydant). Ainsi, nous nous attachons à caractériser ce rôle en étudiant sa fonction dans des modèles murins dans lesquels cette protéine est inactivée ou modifiée (formant alors des « mutants » de cette protéine).

Ces mutants ont été précédemment caractérisés et validés *in vitro* en culture cellulaire. Il est malheureusement impossible de continuer notre étude sur des cultures cellulaires car les questions qui nous intéressent concernent les mécanismes de réponses physiologiques à ces stress (dans le foie en particulier). La culture même de cellules en condition d'hypoxie/normoxie n'a jusqu'à présent pas permis de reproduire les résultats obtenus *in vivo*. Nous persévérons toutefois à établir d'autres dispositifs cellulaires relevant, en parallèle des expérimentations chez l'animal.

Des explorations *in vivo* sont donc à ce stade devenues indispensables pour appréhender la réaction d'un organisme entier et pour éprouver nos hypothèses en situation physiologique, en se rapprochant de celle retrouvée chez le patient. Les animaux utilisés seront des souris modifiées génétiquement pour ne plus exprimer ou exprimer des formes modifiées d'un gène clé de la réponse au stress oxydant. Ces souris seront soumises à un jeûne alimentaire allant de 30 minutes à 18 heures et/ou traitées ou non par différents agents thérapeutiques administrés par injections intrapéritonéales. Les traitements (maximum 30h) et le jeûne seront réduits à une durée minimale pour induire les effets à étudier. Nos études sur des modèles précédents montrent que ces temps de traitement sont suffisants pour obtenir des informations scientifiquement pertinentes sans occasionner de manifestation de mal-être chez l'animal excédant les scores d'évaluation tolérés de celui-ci. En effet nous nous intéressons à la réponse physiologique très précoce au stress. Les traitements que nous utilisons pour induire du stress oxydant, à l'exception du paraquat, sont sans effets délétères pour la souris en raison de la courte durée et des doses que nous utilisons.

L'injection de paraquat a été décrit comme ayant des effets cardiotoxiques et hépatotoxique à partir de 24h de traitement. Nous n'utiliserons ce traitement que pour une durée inférieure à 4h, et euthanasierons les animaux aux premiers signes de souffrances comme précédemment décrit.

Ce projet et la constitution des cohortes d'animaux sont réalisés en accord avec la règle des 3R :

Nous avons au préalable testé nos molécules d'intérêts *ex vivo* sur un maximum de modèles cellulaires cultivables en laboratoire (cellules isolées à partir de patients, cellules souches embryonnaires).

Nos cohortes d'animaux seront réduites au minimum en nous basant sur un test statistique de comparaison de moyennes (test de Student) de nos expériences préalablement menées dans le même type de modèles pour évaluer la variabilité inter-individus.

Les animaux seront hébergés en groupes pour respecter leur comportement grégaire. Une grille d'évaluation de leur comportement sera tenue et différents critères seront scorés de façon à définir des points limites de douleur/souffrance suffisamment précoces pour déclencher le recours à l'euthanasie si ces points limites étaient atteints et qu'aucun traitement n'interférant pas avec l'expérimentation menée ne pouvait y remédier.

Les procédures n'excéderont pas 30h et les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure. La limite haute du nombre total d'animaux prévu pour mener à bien ce projet est de 1134 sur 5 ans. Une banque d'organes sera constituée à partir de chacune des expérimentations menées permettant de mener des études ultérieures en réutilisant des tissus congelés sans avoir à impliquer de nouveaux animaux.

14096 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la troisième cause de mortalité dans les pays industrialisés et la première cause de handicap acquis. Parmi ces AVC, ceux d'origine ischémique (liés à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot) sont les plus nombreux (85%). Après un AVC ischémique (AVCi), le seul traitement disponible est un fibrinolytique, qui permet de restaurer la circulation cérébrale, en détruisant le caillot. Toutefois, cette stratégie n'est pas pleinement satisfaisante, car elle permet de lutter uniquement contre la cause de l'ischémie. De plus, son utilisation est limitée : elle doit être administrée dans les 4h30 après l'apparition des premiers symptômes et elle peut entraîner des complications, en particulier hémorragiques. Ainsi, l'espoir repose donc sur la découverte de stratégies permettant de réduire les handicaps acquis, moteurs et cognitifs, à la suite d'un AVC. Les objectifs de ce projet visent donc à étudier l'effet d'un traitement par une molécule possédant une activité neuroprotectrice, sur (1) les déficits moteurs et cognitifs, et (2) les conséquences histologiques à la suite d'une ischémie cérébrale.

Pour cela, nous utiliserons un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris reproduisant la pathologie humaine. Dans ce modèle largement utilisé, on étudiera les déficits moteurs et cognitifs. A l'issue des tests comportementaux qui analyseront les performances sensorimotrices et cognitives ainsi que le comportement exploratoire, les souris seront euthanasiées pour prélèvement du cerveau afin d'étudier l'effet du traitement par la molécule sur les conséquences histologiques de l'ischémie cérébrale. Le nombre de souris utilisées sera de 78. La bonne reproductibilité, le faible taux de mortalité et d'échec de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Ce modèle d'ischémie cérébrale, qui repose sur l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (appelée artère sylvienne chez l'Homme), sera réalisée sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus en pré- et post-opératoire pour éviter toute souffrance aux animaux.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit à son minimum. La mise en place de points limites, ainsi que l'observation régulière du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée *in vitro* sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans les conséquences ischémiques mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Il est donc indispensable d'associer aux études *in vitro* des études chez l'animal entier soumis à une ischémie cérébrale.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'évaluer l'efficacité de la molécule pour le traitement des déficits moteurs et cognitifs consécutifs à une ischémie cérébrale. Ils pourraient permettre le développement de cette molécule comme médicament pour limiter les handicaps acquis suite à un AVC.

14097 Le récepteur PPAR γ est une protéine nucléaire qui lie naturellement les lipides et agit comme un facteur de transcription dans le processus de l'adipogenèse (stockage des lipides par les adipocytes). Le récepteur PPAR γ intervient également dans le diabète de type 2 et de ce fait, plusieurs ligands synthétiques ont été développés et utilisés en clinique pour potentialiser l'effet de l'insuline dans le traitement de ce type de diabète. Ces ligands appartiennent à la famille des thiazolidinediones (TZD). Depuis ces découvertes, le champ d'action de PPAR γ s'est aujourd'hui considérablement élargi, incluant notamment un rôle dans les processus inflammatoires et les hémopathies (maladies qui touchent la production des cellules sanguines).

Dans le cadre des hémopathies, comme dans le cas de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), le potentiel thérapeutique du récepteur PPAR γ et de ses ligands de synthèse, les TZDs a été évalué « *in vitro* » et en clinique. Des études similaires sont également en cours pour la Polyglobulie de Vaquez (PV, hyper-prolifération des globules rouges), la thrombocytémie essentielle (TE, hyper-prolifération des plaquettes), et la myélofibrose (MF, dégradation du stroma médullaire). Ces études sont développées « *in vitro* » sur des lignées cellulaires, « *ex-vivo* » sur des cellules de patient et « *in vivo* » dans les modèles précliniques de ces maladies pour définir l'impact thérapeutique des TZDs sur la prolifération des cellules sanguines, le contrôle de la réponse inflammatoire et la protection du stroma médullaire.

Parallèlement à ces approches et dans le but de comprendre plus globalement le rôle du récepteur PPAR γ dans la production des cellules sanguines, il est important de caractériser sa fonction physiologique. Il existe en effet, dans le sang, de nombreux ligands naturels de PPAR γ , et le récepteur PPAR γ présente une activation basale en absence de traitement par les TZDs. La compréhension du rôle de cette activation dans la mise en place et la régulation de l'hématopoïèse et de l'inflammation constitue un intérêt fondamental, mais est aussi une donnée complémentaire nécessaire pour comprendre l'intérêt thérapeutique des TZDs (en vue d'une transposition vers la clinique).

Pour répondre à cette problématique nous avons invalidé l'expression de PPAR γ , « *in vitro* » et « *ex-vivo* » dans différents modèles de cellules sanguines, par des stratégies utilisant des ARN interférents. Ces études nous ont permis d'avoir des informations sur des éléments précis (étude du cycle cellulaire, sensibilité à la mortalité cellulaire), mais ne permettent pas de reproduire l'ensemble des interactions qui gouvernent la mise en place et la régulation de l'hématopoïèse. Seul

le passage par un modèle *in vivo* permettra de reproduire l'ensemble des paramètres étudiant l'impact de la modulation de l'inactivation de PPAR γ dans l'hématopoïèse.

Afin d'avoir un modèle stable sans intervention préalable sur l'animal, nous avons choisi de développer une stratégie non invasive de recombinaison CRE/Lox permettant d'inactiver le gène Ppar-g dans les cellules sanguines de souris C57bl6j. Pour ce faire, nous avons fait reproduire deux lignées de souris : la lignée (B6. Cg-Commd10Tg(Vav1-icre) A2Kio/J, The Jackson laboratory) exprimant la recombinase CRE spécifiquement dans les cellules sanguines (expression régulée par le promoteur VAV1) et la lignée de souris (B6. 129-Ppargtm2Rev/J, The Jackson laboratory) présentant des sites LoxP de part et d'autre de l'exon 2 du gène Ppar- γ . Lorsqu'elle est exprimé la CRE excise les fragments d'ADN situés entre les sites LoxP invalidant ainsi l'expression de Ppar γ spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques. Les animaux issus du croisement de ces deux lignées, qu'ils présentent, dans les cellules sanguines, l'inactivation d'un seul allèle PPAR γ (haplo-insuffisant, Ppar- γ +/-) ou des deux allèles PPAR γ (KO pour le gène, Ppar- γ -/-) ne présentent pas de phénotype visible.

Afin d'analyser les effets de l'inactivation de PPAR γ dans les cellules sanguines des souris obtenues, nous procéderons à différents niveaux de caractérisation (nécessitant 236 souris au total):

1) Pour caractériser l'hématopoïèse physiologique, des numérations formules sanguines (hémogrammes) devront être réalisées à chaque stade du développement des souris (entre 6 semaines et 2 ans. La taille de la rate, le nombre de cellules dans la moelle et leur capacité à générer des cellules sanguines ainsi que l'analyse anatomopathologique de la fibrose de la moelle et de la rate seront réalisés après l'euthanasie des animaux (60 animaux nécessaires).

2) La capacité des cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse à reconstituer l'hématopoïèse des souris haplo-insuffisantes (-/+) ou Ko pour Ppar γ (-/-) sera évaluée par transplantation compétitive avec de la moelle d'animaux normaux pour Ppar γ (+/+) (56 animaux nécessaires).

3) La réponse à un stress hématologique des souris Ppar γ +/- ou -/- (Versus Ppar +/+) sera évaluée par injection d'un analogue pyridinique le 5 fluoro-uracile (5FU, Chimiothérapie) (60 animaux nécessaires).

4) La réponse à un stress inflammatoire des individus Ppar γ +/- ou -/- (Versus Ppar +/+) sera évaluée par injection intra-péritonéale de lipopolysaccharides (LPS) (60 animaux nécessaires).

Les rongeurs étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum (236) en tenant compte du nombre nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Ils seront hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie. Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre. Les interventions qui pourraient engendrer de la souffrance seront réalisées sous anesthésie/analgésie. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupes permettent de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

14098 Les pathologies infectieuses néonatales et infantiles sont un problème majeur en santé humaine et animale. Les infections intestinales causent notamment 1,7 milliard de cas de diarrhée chaque année dans le monde et sont la deuxième cause de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans. Les rotavirus et les Escherichia coli sont les causes principales des diarrhées infectieuses chez les jeunes mammifères et peuvent provoquer des maladies, des retards de croissance, des pertes économiques...

La lutte contre les infections, et en particulier les infections intestinales, représente donc un enjeu de santé publique et économique majeur et il existe encore aujourd'hui un grand besoin de développer de nouveaux traitements pour prévenir ou guérir ces infections.

L'intestin des mammifères est dépourvu de microorganismes avant la naissance mais aussitôt après leur naissance, leurs muqueuses sont colonisées par une variété de microorganismes et forment

rapidement un microbiote très dense et diversifié. Une relation mutuellement bénéfique s'établit alors entre l'hôte et les microorganismes qui occupent son intestin. Cependant, la muqueuse intestinale constitue un environnement à l'équilibre fragile du fait qu'elle peut être envahie par des microorganismes pathogènes qui utilisent cette muqueuse comme une voie d'entrée dans l'organisme et provoquent ainsi des infections. C'est le rôle du système immunitaire que de mettre en place des réponses différenciées vis-à-vis des microorganismes commensaux (bénéfiques) et pathogènes. Le microbiote intestinal joue également un rôle majeur dans la défense contre les pathogènes en entrant en compétition avec eux et surtout en stimulant le développement et la maturation du système immunitaire.

Il a été récemment démontré que la bactérie *Bacteroides thetaiotaomicron*, un membre dominant du microbiote intestinal humain, était capable de maturer à lui seul le système immunitaire intestinal à un niveau proche de celui observé avec un microbiote intestinal complet. De plus, de nombreux travaux ont montré que certaines souches de bactéries lactiques, notamment des *Lactobacilles*, avaient des propriétés immunomodulatrices et pouvaient s'avérer protectrices vis à vis de certains pathogènes.

Nous proposons donc de tester l'effet préventif de *B. thetaiotaomicron* ou de souches sélectionnées de *Lactobacilles* (probiotiques) dans deux modèles animaux d'infection ayant une pertinence aussi bien chez l'homme que chez l'animal : le rotavirus et *Citrobacter rodentium*.

Les résultats concernant la découverte des propriétés de *B. thetaiotaomicron* ont été obtenus avec des souris C57Bl/6j axéniques. Dans un premier temps, nous prévoyons de reproduire ces résultats avec des animaux conventionnels de la même lignée. Nous envisageons également d'utiliser une lignée de souris Swiss, non consanguine, dont les portées sont plus importantes et robustes, ce qui réduira le nombre de femelles gestantes impliqué.

Les expériences seront très probablement réalisées sur les deux lignées (C57Bl/6j et Swiss) en parallèle, pour au moins un des modèles infectieux, afin d'analyser le comportement de ces deux lignées dans des situations comparables. Nous espérons que les résultats obtenus avec les souris Swiss nous permettront de poursuivre avec cette lignée notamment pour réduire le nombre d'animaux. Nous souhaitons également conserver la possibilité de revenir à la lignée C57Bl/6j dans les cas suivants :

- 1- Résultats non transposables aux souris Swiss (incluant la non reproductibilité des modèles infectieux, les souches courantes de laboratoires pouvant montrer des susceptibilités très différentes à un même pathogène et la littérature concernant les souris Swiss étant peu abondante)
- 2- Besoin de recourir à des modèles génétiquement modifiés à moyen/long terme, afin de préciser à un niveau plus moléculaire les mécanismes mis en jeu dans les effets probiotiques de nos bactéries et la relation hôte/microbiote/pathogène, en utilisant des modèles d'inactivation génétique conditionnels essentiellement basés sur fond génétique C57.

Le projet se déroulera sur une période de 3 ans et nécessitera 1008 animaux de chacune des deux lignées étudiées soit un total maximal de 2016 souris.

Ainsi, les animaux recevront dès leur plus jeune âge les bactéries probiotiques par administration orale et seront ensuite infectés par l'un de ces deux agents pathogènes (gavage) afin de mesurer l'effet potentiellement bénéfique sur la sévérité des symptômes, lesquels seront mesurés selon des critères cliniques définis : score basé sur l'aspect des selles, suivi quotidien de la courbe de prise de poids.

Dans une volonté de respecter la règle des 3R, nous avons prévu d'utiliser au maximum les expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Cependant, l'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal (en l'occurrence murin) pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Nos groupes de souris seront réduits à deux portées (entre 8 et 12 animaux) par groupe car travailler avec un effectif plus faible ne permettrait pas d'obtenir des résultats statistiquement significatifs étant donné la variabilité de ces expérimentations animales et la mortalité post natale caractérisée chez la souris. Chacune des expérimentations est effectuée avec des doses adaptées

à l'âge et au poids des animaux. Enfin, les points limites sont clairement définis : les animaux ne prenant pas ou perdant du poids deux jours consécutifs seront euthanasiés. Les animaux seront hébergés par groupe de deux femelles avec leur portée, avec un enrichissement de cellulose et de "maisons" en plastique rouge (opaque pour la vision des souris) permettant la réalisation d'un nid. La séparation des souriceaux et de leur mère sera limitée à quelques secondes chaque jour au moment du gavage et de la pesée, et les animaux seront manipulés un à un en laissant la portée auprès des mères.

14099 Chez l'animal comme chez l'Homme, le choc septique entraîne une activation importante de la réponse immunitaire associant une réponse pro-inflammatoire initiale suivie par une phase d'immunosuppression susceptible de favoriser des surinfections et/ou décès. Le sepsis est une priorité mondiale en matière de santé car il cause un nombre élevé de décès chez les patients en unité de soins intensifs. On estime que l'incidence de la sepsie dépasse 30 millions de cas dans le monde chaque année, avec des taux de mortalité atteignant 30%, malgré les progrès de la gestion des soins intensifs. En 2017, l'organisation mondiale de la santé a adopté une résolution visant à améliorer la prévention, le diagnostic et la gestion de cette maladie mortelle. Cependant les mécanismes impliqués dans la réponse au choc septique restent encore peu connus.

La cochline, est une protéine extracellulaire très abondante dans la cochlée et le vestibule de l'oreille interne. En utilisant des modèles murins, il a été récemment décrit que le domaine LCCL de la protéine cochline améliore la réponse innée de l'hôte contre les infections bactériennes.

Dans cette étude il sera démontré que le domaine LCCL de la cochline est impliqué dans la réponse immunitaire chez la souris, pour cela un choc septique sera induit par la procédure de ligature et ponction caecale (CLP).

Lors d'une première série d'expériences, différents types de ponctions seront testées pour déterminer la sévérité de notre modèle, ainsi le type de ponction le plus efficace, le plus spécifique et le mieux toléré par les animaux sera déterminé.

Dans une deuxième série d'expériences la réponse immunitaire d'un groupe de souris WT avec un groupe de souris génétiquement modifié dépourvu de la protéine cochline sera comparé, ces 2 groupes ayant subi une CLP.

Ce projet vise à étudier la réponse antibactérienne dépendante de la LCCL qui pourrait constituer une approche antibactérienne innovante contre une infection bactérienne et à élucider le mode d'action antibactérien de la LCCL cochlinique

La prise en charge de la douleur sera réalisée grâce à une anesthésie générale et locale au niveau du site opératoire en suivant les bonnes pratiques de chirurgie et grâce à un traitement analgésique mis en place avant l'induction de l'anesthésie et poursuivi pendant 2 jours après l'intervention.

L'objectif de cette étude est de préciser le rôle de la cochline dans la réponse immunitaire, il s'agit d'un travail de physiologie qui ne peut s'envisager que chez l'animal. Le bien-être des souris à l'issue de la chirurgie sera favorisé grâce au placement de la cage sur tapis chauffant en présence d'aliments humides et d'une litière de cellulose. Une surveillance des symptômes et de l'atteinte des points limites sera réalisée quotidiennement jusqu'à mise à mort des souris à J+5 après la chirurgie. Des points limites seront définis au-delà duquel les souris seront mises à mort afin de limiter au maximum leurs souffrances.

Afin de minimiser le nombre d'animaux inclus, un calcul du nombre de souris par groupe a été réalisé. Considérant l'ensemble des conditions présentées dans le protocole, 60 souris maximum sont nécessaires.

Les résultats obtenus dans cette étude nous permettront de démontrer le rôle de la protéine Cochline au cours d'un sepsis chez la souris.

14100 Les dispositifs médicaux constituent un élément clé à la fois dans le domaine diagnostique et dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, ils incarnent des produits ingénieux dont la recherche et le développement s'avèrent désormais indispensables pour satisfaire l'ensemble des besoins de santé. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en

contact avec le corps humain. Dès lors, ils constituent une source potentielle de réactions indésirables comme des allergies, des irritations, voire des réactions généralisées de l'organisme.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordiale pour y parvenir intégralement. En effet, si des méthodes alternatives existent, elles ne permettent pas de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux dispositifs médicaux, en particulier en raison de leur complexité chimique.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs (cobayes, souris, hamsters) et de lapins. Le nombre minimum d'animaux est défini dans les textes de référence. L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 36 100 cobayes, 30 100 souris, 4 300 lapins et 200 hamsters soit un total de 70700 animaux.

Par ailleurs, lorsque les interventions seront susceptibles d'endolorir l'animal, des mesures seront envisagées. De plus, tous les animaux jouiront d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des procédures. Enfin, les animaux grégaires seront hébergés en groupes dès que l'essai le permet ; des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères seront maintenus dans tous les cas ; des chaînettes sont suspendues aux cages des lapins afin qu'ils puissent se divertir et des plateformes sont disposées pour qu'ils puissent s'isoler lorsqu'ils le souhaitent ; des objets en bois sont aussi distribués aux lapins et cobayes afin de favoriser l'activité d'exploration et de mastication ; des objets de nidification ou des objets en bois sont aussi distribués aux souris et hamsters. Enfin, de la musique sera diffusée dans les salles d'hébergement pour apaiser les animaux.

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

14101 Contexte:

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est une marque épigénétique caractérisée par l'ajout d'un groupement méthyl sur le carbone 5 des cytosines de l'ADN. La méthylation de l'ADN est abondante dans le génome et a des fonctions de régulation de l'expression des gènes chez les mammifères. Cette réaction chimique est catalysée par les enzymes de la famille des DNMT (ADN méthyltransférases) : Dnmt1, Dnmt3a et Dnmt3b. Le projet s'intéresse plus particulièrement à l'enzyme Dnmt3a qui est essentielle pour la mise en place des profils de méthylation de l'ADN dans le génome au cours du développement et de la croissance embryonnaire. Il est donc important de mieux comprendre les fonctions biologiques de Dnmt3a chez les mammifères.

Objectifs:

A ce jour, les fonctions moléculaires de Dnmt3a au cours du développement embryonnaire sont encore mal connues. Pour répondre à cette problématique, nous proposons d'élever et d'étudier des lignées de souris mutantes pour le gène Dnmt3a. Nous étudierons les profils de méthylation de l'ADN et d'expression des gènes dans les souris contrôles et mutantes pour le gène Dnmt3a à plusieurs stades du développement. Ces données permettront d'identifier les séquences cibles méthylées par Dnmt3a et l'importance de cette méthylation pour la mise en place des profils d'expression de gènes dans plusieurs lignages cellulaires. Ce projet permettra de faire avancer la connaissance sur les fonctions biologiques de Dnmt3a dans les processus de développement et la mise en place de l'identité des cellules chez les mammifères.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de 768 souris, en adéquation avec la règle des 3R :

Réduire: Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, nous limiterons les groupes statistiques à 5 ou 8 animaux en fonction des analyses effectuées. De plus nous utiliserons des kits permettant de préparer des échantillons ADN et ARN à partir du même prélèvement tissulaire, ce qui limitera le nombre d'animaux utilisés pour préparer les échantillons.

Raffiner: Les souris seront élevées en groupe dans des cages enrichies avec une maison, des tubes en carton et du matériel de nidification. Les procédures n'incluent aucune expérience invasive sur

des animaux vivants. Les animaux et les conditions d'élevage seront surveillés quotidiennement au cours du projet, et nous établirons des points limites pour arrêter l'expérience et atténuer la souffrance de l'animal le cas échéant.

Remplacer : Les modèles cellulaires en culture accumulent des anomalies épigénétiques en culture et ne récapitulent pas les dynamiques de méthylation de l'ADN observées au cours du développement embryonnaire, c'est pourquoi nous effectuerons ces expériences sur des échantillons de tissus primaires de lignées de souris.

14102 Contexte:

La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique caractérisée par l'ajout d'un groupement méthyl sur le carbone 5 des cytosines de l'ADN. Cette marque chimique est abondante sur l'ADN des mammifères et a des fonctions importantes pour le développement et la régulation de l'expression des gènes chez les mammifères. De plus, l'étude de la méthylation de l'ADN est un prérequis pour comprendre l'étiologie des cancers et identifier de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques. La méthylation de l'ADN est catalysée par les enzymes de la famille des ADN méthyltransférases (Dnmt). L'enzyme Dnmt1 a besoin d'un partenaire protéique appelé Uhrf1 afin de maintenir la méthylation de l'ADN au cours des divisions de la cellule. L'implication de Uhrf1 dans la méthylation de l'ADN a été pleinement étudié au cours des dernières années, cependant Uhrf1 a un paralogue très conservé chez les mammifères appelé Uhrf2 qui possède la même structure protéique que Uhrf1. Peu de choses sont connues à ce jour sur les fonctions de Uhrf2 dans la régulation de la méthylation de l'ADN.

Objectifs:

L'objectif du projet est d'utiliser des lignées de souris invalidées pour le gène Uhrf2 afin d'étudier le rôle de Uhrf2 chez la souris. Nous préparerons des échantillons d'ADN pour comparer les profils de méthylation de l'ADN dans les souris contrôles et mutantes pour le gène Uhrf2 à plusieurs stades du développement de la souris. Ces données seront complétées par des analyses phénotypiques et histologiques sur des échantillons de tissus de souris contrôles et mutantes. Ce projet permettra d'élucider les fonctions biologiques de Uhrf2 dans la régulation de la méthylation de l'ADN et le développement chez les mammifères. Ces recherches auront des retombées en recherche fondamentale et à long terme pour comprendre les mécanismes épigénétiques de la cancérogenèse.

Le projet prévoit l'utilisation de 1168 souris, en adéquation avec la règle des 3R :

Réduire: Nous utiliserons des analyses statistiques permettant de limiter les groupes statistiques à 5 ou 8 animaux selon les analyses effectuées. Nous utiliserons les mêmes animaux pour les tests phénotypiques et les prélèvements de tissus, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés. Pour étudier la méthylation de l'ADN, nous utiliserons des méthodes optimisées pour de faibles quantités de cellules (~5000 cellules), ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés pour préparer les échantillons.

Raffiner: Les souris seront élevées en groupe dans des cages enrichies avec une maison, des tubes en carton et du matériel de nidification. Les procédures n'incluent aucune expérience invasive induisant une douleur ou un stress sur des animaux vivants. Les conditions d'élevage et la santé des animaux seront surveillés quotidiennement au cours du projet, et nous avons établis des points limites permettant de soustraire un animal à la procédure et atténuer la souffrance et le stress de l'animal le cas échéant.

Remplacer : Les cellules en culture *in vitro* ne peuvent pas se substituer efficacement aux analyses *in vivo* car elles accumulent de nombreuses anomalies épigénétiques. C'est pourquoi nous effectuerons nos expériences sur des échantillons primaires isolés à partir de souris.

14103 La néphronophtise (NPH) et les hypodysplasies rénales (HDR) représentent les causes génétiques majeures d'insuffisance rénale terminale de l'enfant. Il n'existe pas actuellement de traitement permettant d'éviter l'évolution vers l'insuffisance rénale. Les seules solutions thérapeutiques à ce jour sont la dialyse et la transplantation. Plusieurs gènes dont les mutations sont responsables de

ces maladies ont été identifiés, mais ces gènes n'expliquent qu'une partie de ces maladies qui sont hétérogènes sur le plan clinique ainsi que sur le plan génétique. D'autres gènes impliqués sont encore à caractériser.

L'objectif de ce projet est multiple : (1) valider l'implication de nouveaux gènes dans la pathologie, afin d'améliorer le diagnostic génétique des patients, (2) comprendre *in vivo* les mécanismes physiopathologiques de ces maladies, et (3) mener des études pré-cliniques pour valider l'effet thérapeutique de molécules identifiées *in vitro*.

Pour répondre à ces objectifs, des modèles animaux, poisson zèbre et souris, invalidés pour les gènes candidats de ces maladies seront générés. Leur analyse sera ciblée sur les organes les plus fréquemment affectés chez l'homme : le rein, le cerveau, l'œil et les testicules. Dans les modèles poisson zèbre, l'analyse des animaux mutants sera principalement réalisée aux stades embryonnaires et larvaires. Toutefois, l'élevage d'une partie de ces mutants sera poursuivi jusqu'à l'âge adulte avec un suivi de leur survie et des signes cliniques pathologiques. Dans les modèles murins, les études seront réalisées aux stades embryonnaires E 9.5 et E 12.5, dans le cas des gènes NPH, entre 15 et 28j pour le phénotype oculaire, à 45j pour la stérilité, et de 1 à 9 mois pour le phénotype rénal. En l'absence de phénotype rénal chez les animaux adultes, nous générerons des animaux doubles mutants, susceptibles de développer spontanément des lésions. Alternativement, nous induirons des lésions du tissu rénal pour provoquer l'apparition d'anomalies similaires à celles observées chez les patients : en injectant un agent néphrotoxique en intrapéritonéal (poisson zèbre), et en pratiquant des néphrectomies subtotaux (la souris). Pour l'étude pré-clinique des agents thérapeutiques, les protocoles de traitement (durée, dose, fréquence, mode d'administration) seront déterminés selon les données de la littérature. Les animaux seront sacrifiés à l'issue des protocoles. Le prélèvement des organes sera réalisé en post mortem pour les analyses histologiques et moléculaires qui devraient permettre d'évaluer la capacité des agents thérapeutiques à réduire les lésions.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats. Nous favoriserons le modèle poisson zèbre par rapport à la souris, à la fois pour l'étude des nouveaux gènes et l'effet des agents thérapeutiques. Au total ce projet nécessitera 1315 animaux dont 595 poissons zèbres et 720 souris pour une étude sur 5 ans. Une anesthésie générale gazeuse quand nécessaire sera utilisée chez la souris afin de réduire toute souffrance. Pour limiter l'angoisse des animaux, une surveillance quotidienne sera réalisée pour chaque procédure et des antalgiques seront administrés en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Pour conclure, les résultats obtenus devraient apporter une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies de type NPH/HDR et permettre le développement de médicaments capables de limiter leur progression.

14104 Les pneumonies bactériennes restent un problème majeur de santé publique, notamment chez les personnes âgées. Nous nous intéressons aux infections par le pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) qui est la première cause de pneumonie bactérienne chez l'homme. Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'altération des mécanismes de défense contre cette bactérie, notamment ceux liés à l'âge et aux infections respiratoires virales (dont la grippe). Ce programme pourrait conduire au développement de nouvelles méthodes permettant de mieux contrôler les pneumonies bactériennes.

Deux procédures sont décrites : infection par *S. pneumoniae* (procédure 1) et infection par le virus influenza A puis par *S. pneumoniae* (procédure 2). Nous utilisons un modèle expérimental (souris) admis par la communauté scientifique travaillant dans le domaine. Notre équipe a bénéficié et bénéficie actuellement d'une autorisation pour travailler sur le virus influenza A et sur *S. pneumoniae*. L'évaluation rétrospective de ce protocole est en cours. Par rapport à ces autorisations, aucun changement majeur ne sera pratiqué. Les changements concernent l'âge des souris (des souris de 18 mois seront utilisées) et les heures d'infection (procédure 1). Dans les deux

procédures, des souris déficientes (knock-out) pour l'expression de certains gènes seront utilisées. Nous proposons aussi des traitements, notamment avec des composés pharmacologiques.

Des travaux montrent qu'en fonction de l'heure de l'exposition aux agents pathogènes, le système immunitaire est plus ou moins efficace. Ce phénomène est lié à notre horloge biologique. Le vieillissement s'accompagne d'un phénomène d'immunosénescence qui favorise la susceptibilité aux infections. Le vieillissement est aussi associé à un dérèglement de l'horloge biologique. Notre objectif est de mieux comprendre ces phénomènes et d'établir un lien entre âge, rythme circadien et immunité antibactérienne. Nous étudierons l'influence de l'âge et du rythme circadien sur les mécanismes de défense dirigés contre le pneumocoque (procédure 1). Nous souhaitons identifier des candidats responsables de la susceptibilité à l'infection chez les souris âgées. En fonction des résultats, nous manipulerons le système immunitaire par différentes approches. Pour la deuxième procédure (projet différent), nous traiterons les souris au cours de la grippe avec des composés immunomodulateurs (acides gras à chaînes courtes) afin de limiter les surinfections bactériennes (pneumocoque).

La demande concerne (i) l'infection des souris avec le pneumocoque, (ii) l'infection des souris avec le virus grippal puis le pneumocoque, (iii) le suivi des souris infectées, (iv) l'analyse des mécanismes immunologiques sous-tendant la résistance à l'infection par le pneumocoque et (v) l'effet des traitements sur l'infection.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Au total, 4816 souris seront nécessaires pour atteindre nos objectifs. Cette utilisation maximise les données obtenues à partir de chaque animal, afin de limiter ou d'éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Si nécessaire, des modifications des procédures sont prévues au cours des expérimentations afin de réduire la douleur et la détresse ainsi que d'améliorer le bien-être animal. Les animaux seront manipulés individuellement afin de limiter tout stress des animaux non manipulés. Les souris ne sont pas soumises à des prélèvements répétitifs.

14105 Le tissu adipeux subit de nombreux remaniements qui permettent de stocker et libérer l'énergie dont a besoin l'organisme. Ce processus modulable peut devenir nocif lorsqu'il est mal contrôlé. En effet, le remaniement inadapté de ce tissu chez les humains ainsi que les souris obèses est associé à la présence d'adipocytes de plus grande taille et d'une inflammation chronique du tissu gras, conduisant généralement à un diabète de type 2 insulino-dépendant et des complications cardiovasculaires. La compréhension des troubles métaboliques survenant au cours du temps est primordiale car le vieillissement constitue un risque majeur de résistance à l'insuline et du diabète. Notre laboratoire s'intéresse à la protéine Hélios qui est impliquée dans l'établissement des cellules sanguines et immunitaires. De manière intéressante, la protéine Hélios est fortement présente dans des cellules immunitaires contrôlant l'inflammation du tissu gras. De façon intéressante, nous avons constaté une réduction de la masse grasse abdominale chez les souris déficientes pour Hélios comparées aux souris sauvages au cours du vieillissement. Ces données suggèrent que Hélios pourrait être impliquée dans le métabolisme chez les souris au cours du vieillissement en réduisant l'inflammation du tissu gras.

Pour confirmer cette hypothèse nous allons utiliser des lignées de souris déficiente pour Hélios dans l'ensemble de l'organisme et plus spécifiquement dans les cellules contrôlant l'inflammation. Nous allons donc chercher à confirmer ces résultats en mesurant l'obésité et l'inflammation dans les tissus gras de ces souris lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisse pendant quelques semaines (8 à 16 maximum). D'autre part, nous allons déterminer si la protéine Hélios chez les souris âgées est impliquée dans le métabolisme par l'accumulation de masse graisseuse abdominale ainsi que dans l'inflammation du tissu gras. L'ensemble de ces expériences nous permettra de déterminer si Hélios peut constituer une cible thérapeutique visant à réduire la résistance à l'insuline et le diabète au cours du vieillissement.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée.

Pour répondre à cet objectif, et afin de pouvoir réaliser des analyses ANOVA ainsi que des tests statistiques (Student t-test), nous prévoyons d'analyser des groupes de 6 souris/ condition/ sexe (comme cela a été précédemment décrit dans l'article de Lin S et al), soit 96 souris pour le projet global. Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront particulièrement observées pour l'apparition de lésions cutanées pouvant survenir suite à un hyper toilettage lors de régimes riches et au niveau des sites d'injections. Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront appliquées si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici: en effet, nous devons avoir recours à un modèle *in vivo* afin d'étudier le métabolisme et l'inflammation au cours du vieillissement de l'organisme. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à des modèles *in vitro*. En ce qui concerne les modèles *in vivo*, la souris est un modèle de choix pour l'analyse génétique et les modèles d'obésités.

14106 L'insuline est une hormone essentielle, jouant un rôle central dans de nombreux dérèglements et maladies métaboliques dont le diabète de type 2 (DT2). L'absence d'insuline dû à la destruction des cellules pancréatiques qui la produise est également responsable du diabète de type 1 (DT1). L'insuline est le signal spécifique qui permet à l'organisme de baisser son taux de glucose sanguin. Un taux de glucose sanguin trop élevé est l'une des caractéristiques du Diabète. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de sécrétion de cette hormone sont importants d'un point de vue thérapeutique. La perte de sensibilité à l'insuline ou insulino-résistance est un des symptômes chez les personnes diabétiques de type 2. Elle est souvent accompagnée d'une phase de compensation durant laquelle les individus hyper-sécrètent de l'insuline. Cette hyper sécrétion induit un stress pour les cellules bêta des îlots de Langerhans, seules cellules de l'organisme capables de sécréter l'insuline.

Récemment, nous avons découvert que les cellules bêta pancréatiques dégradent l'insuline en période de jeûne afin notamment d'empêcher la libération indésirable d'insuline. Toutefois, une mauvaise régulation de cette dégradation pourrait provoquer aussi la pénurie d'insuline qui caractérise les cellules bêta pancréatiques chez les patients diabétiques. Après avoir validé notre découverte *in vitro*, nous souhaitons maintenant apporter la preuve *in vivo* du rôle de la dégradation des granules d'insuline dans le Diabète. Pour ce faire, nous souhaitons utiliser un modèle de souris connu pour devenir diabétique avec lequel nous testerons l'effet d'un inhibiteur pharmacologique. Cet inhibiteur cible spécifiquement une protéine impliquée dans la dégradation de l'insuline au cours du diabète et doit ainsi permettre de valider notre découverte.

Remplacement : La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduction : Nous utiliserons un total de 480 souris. Le nombre d'animaux testé dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique adaptée entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction.

Raffinement : Les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation des animaux. Les chirurgies seront pratiquées sous anesthésie générale par du personnel compétent. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour les analyses biochimiques et les volumes injectés seront adaptés au poids de chaque animal afin de ne pas induire de stress supplémentaire. Les conditions d'hébergement des animaux respectent la directive européenne 2010/063EU. Pour optimiser le bien être animale, les cages seront enrichies avec du coton et du carton. Sachant que l'une des conséquences directes du diabète chez ces souris est l'augmentation des mictions, un suivi quotidien de l'état de la cage sera réalisé. Les techniciens devront changer la cage dès que nécessaire en limitant au maximum d'impacter le bien-être des souris. Les animaux seront manipulés avec des méthodes de contention adaptées par du personnel entraîné et qualifié. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, elles seront surveillées quotidiennement pour réduire tout inconfort ou douleur qui se développerait. Un protocole analgésique est mis en place pour limiter la douleur des animaux engendrée par la chirurgie et un suivi régulier est aussi mis en place post-chirurgie pour s'assurer du bien-être des

animaux. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, après avis vétérinaire.

14107 Le système nerveux central (SNC) intègre en permanence des signaux hormonaux et nerveux de faim et de satiétés pour élaborer une réponse adaptative au niveau comportementale et métabolique pour maintenir la balance énergétique.

L'hypothalamus contient au moins 2 populations neuronales qui sont considérées comme de « premier ordre » dans l'intégration de ces signaux, les neurones à Neuropeptide Y et agouti-related protein (NPY/AgRP) qui stimulent la prise alimentaire et diminuent la dépense énergétique et les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) qui diminuent la prise alimentaire et stimulent le catabolisme. Ce réseau neuronal définit la voie dite « à la mélanocortine » et une altération de ce réseau conduit à la mise en place syndrome métabolique. Nous disposons d'un modèle animal dans lequel les neurones NPY/AgRP peuvent être sélectivement éliminés à la naissance.

La perte de ses neurones oréxigènes (neurones stimulant l'appétit) conduit à une diminution de la réponse hyperphagique après un jeûne sur régime standard, mais cette réponse se normalise sur régime palatable, agréable au goût. De plus la perte des neurones NPY/AgRP se traduit par la mise en place d'une obésité, non hyperphagique, qui semble paradoxalement associée à une relative protection contre les effets diabétogènes d'un régime hyperlipidique.

Les objectifs du projet étant de caractériser la spécificité d'une molécule (mMaf-ghrelin) capable d'inhiber de manière transitoire l'activité des neurones AgRP et donc la faim, et ce de manière réversible. La molécule ayant pour cible les neurones AgRP, l'absence de ces neurones devrait se traduire par une absence d'effet (démontrant la spécificité) et l'inhibition temporaire de l'activité des neurones chez les animaux contrôles devrait se traduire par une diminution de l'appétit.

Nous considérons que cette étude apportera une information importante concernant la composante comportementale de la prise alimentaire et de la balance énergétique chez la souris dans les différentes conditions décrites. Ce sont des paramètres très sensibles où le bien être animal est absolument crucial, autant pour l'animale que pour la validité des résultats obtenus. Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé afin d'être en adéquation avec la règle éthique des 3 R, remplacer, réduire et raffiner : notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins adéquats, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort ; et nous réduisons au maximum nos effectifs de souris à 40 afin d'avoir des résultats fiables. Cette expérience ne peut être remplacée car nous avons besoin de voir l'impact d'une molécule sur un organisme via une population neuronale.

14108 Quelle que soit son étiologie, le diabète non contrôlé entraîne des complications macro et microvasculaires allant de la rétinopathie à l'athérosclérose. Il est maintenant largement reconnu qu'une normalisation rapide et agressive de la glycémie diminue les pathologies microvasculaires contrairement à une prise en charge plus tardive. Cela a conduit au concept de mémoire métabolique reliant les événements vasculaires délétères tardifs à un contrôle métabolique inadéquat aux premiers stades du diabète. Notre projet vise à combler les lacunes dans les connaissances actuelles sur la mémoire métabolique dans les tissus métaboliquement actifs (Foie, tissus adipeux, muscle et cœur). L'antagoniste du récepteur à l'insuline (S961) est un peptide mimant rapidement les effets physiopathologiques observés chez les sujets diabétiques : insulino-résistance, hyperglycémie, hyperinsulinémie. L'utilisation d'une telle molécule permet d'induire ces perturbations rapidement (7 jours) et de manière réversible. De plus, nous avons pu observer dans le cadre d'une expérimentation antérieure que les signalisations des récepteurs nucléaires (RN) REV-ERB alpha et PPAR alpha (régulant le rythme circadien et le métabolisme lipidique) étaient altérées par le S961. Cette première étude tend à prouver que la modulation de ces RN pourrait être impliquée dans les phénomènes de mémoire métabolique. Ces RN seraient à ce titre des cibles thérapeutiques potentielles. Afin de prendre en compte les modulations circadiennes des expressions et activités de ces RN nous souhaitons mettre en place cette approche sur 2 créneaux

horaires afin de mieux caractériser leur implication dans la mise en place de cette mémoire métabolique. Pour chaque créneau horaire, 300 souris seront utilisées : 20 souris appartiendront au groupe référence avant toute intervention (contrôle J0). Cent quarante souris seront traitées par le S961 pendant 7 jours puis entreront dans une phase de récupération avant d'être nourris avec d'un régime diabétogène ou standard en présence ou non de ligand de récepteur nucléaire dont l'activité est altérée par l'épisode diabétique (REV-ERB alpha et PPAR alpha). A l'issue de chaque étape 20 animaux seront mis à mort afin de confirmer le bon déroulement de la procédure d'instauration d'un phénomène de mémoire métabolique (J7, J14, J20, J55, J83). De la même façon 140 animaux seront traités par une solution saline iso-osmotique et répartis dans les divers groupes présentés ci-dessus, soit un total de 600 souris. Cette étude ne peut être réalisée qu'à l'aide de souris afin de mettre en place un phénomène de mémoire métabolique nécessitant à la fois une insulino-résistance, une hyperglycémie, et une communication inter-organe, dans un contexte circadien. Toutefois, dans le but de remplacer au maximum les animaux utilisés nous disposons de modèles cellulaires au laboratoire qui seront utilisés pour mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués (réduction, remplacement). Enfin, nous étudierons les conséquences de cette mémoire métabolique sur un grand nombre d'organes (foie, cœur, cerveau, intestin, muscles et tissu adipeux) en impliquant l'ensemble des équipes constituant notre unité dans le but d'utiliser au maximum le matériel biologique généré au cours de cette étude (raffinement).

14109 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés pour la cicatrisation des plaies cutanées. Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les porcins et les rongeurs (rats, cobayes, souris) sont des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 2150 sur la période des 5 ans soit 430 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude grâce à un suivi quotidien et des examens vétérinaires dès que nécessaire. Une acclimatation de chaque animal est prévue avant toute inclusion dans le projet. Quelles que soient les études, la douleur est

rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie) et ce durant toute la durée de l'étude. Les rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal et des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères seront dans tous les cas maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (bâton ou balle à ronger pour les rongeurs et jouets pour les porcins) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

14110 Les maladies cardiovasculaires, notamment les pathologies touchant les vaisseaux sanguins, demeurent encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Malgré le développement de nouvelles techniques chirurgicales et peu invasives, la revascularisation des artères pose encore problème. Il existe une importante demande clinique en nouvelles prothèses vasculaires synthétiques et durables.

Les prothèses synthétiques sont performantes pour la revascularisation des artères de moyen et gros calibres, mais donnent des résultats médiocres lorsqu'il s'agit de revasculariser des artères de petit calibre (< 6 mm, ex. coronaires, artères périphériques).

L'objectif de cette étude est d'évaluer des biomatériaux comme prothèse vasculaire pour le remplacement de vaisseaux pathologiques de petit diamètre. La prothèse vasculaire doit supporter la chirurgie ainsi que les conditions hémodynamiques qui s'exercent sur la paroi vasculaire *in vivo* (contraintes mécaniques et variations de pression). Les propriétés mécaniques de la prothèse doivent être proches de celles du vaisseau receveur afin de limiter les perturbations dû au flux sanguin. Nous souhaitons déterminer le devenir de ces prothèses dans un modèle de remplacement vasculaire chez le rat, au cours du temps : vérifier son intégration, sa dégradation et sa colonisation par les cellules de l'hôte.

L'intervention sur des rats sera réalisée sous anesthésie générale (anesthésie gazeuse + analgésique). Un segment de l'aorte sera alors remplacé par une prothèse vasculaire. Nous allons suivre la perméabilité des prothèses (vérifier que les prothèses ne sont pas bouchées) à 7 jours, 1 mois, 3 et 6 mois post implantation. La perméabilité sera évaluée par l'imagerie IRM (imagerie par résonance magnétique) suivi par une évaluation histologique.

Cette étude a été conçue dans le respect du bien-être animal en appliquant la règle des 3 R :

Remplacer : devant la complexité physiologique de la thrombose, l'évaluation de la perméabilité des prothèses ne peut s'apprécier que sur modèle animal. Actuellement aucun modèle *ex vivo* ne peut simuler cet événement.

Raffiner : l'acquisition des images *in vivo* n'étant pas douloureuse, l'animal est maintenu sous anesthésie gazeuse légère uniquement pour limiter ses mouvements et son stress. Après l'intervention chirurgicale, les animaux sont surveillés jusqu'à la phase de réveil puis tous les jours par du personnel bien formé. Une injection sous cutanée d'un analgésique sera réalisée pour réduire la douleur.

Une grille d'évaluation de la douleur (points limites sont stricts, adaptés et précoces), tout au long de l'étude, a été mise en place et si l'animal atteint un certain score, il recevra une injection sous cutanée d'un analgésique, au-delà, l'animal sera euthanasié.

Réduire : le nombre minimum d'animaux à utiliser a été déterminé d'après un test statistique (test de Kruskal-Wallis) prenant en compte la variabilité biologique inter-individuelle et les risques dus à la chirurgie. Un nombre de 10/12 animaux par groupe est nécessaire pour assurer des résultats statistiquement pertinents. Ne seront implantées que les prothèses qui répondent, *in vitro*, aux bonnes propriétés mécaniques (supporter une pression, résister à la suture) ce qui participe aussi à la réduction du nombre d'animaux.

Cette étude nécessite l'utilisation de 328 rats sur 5 ans. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de l'expérience.

14111 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche fondamentale et a pour but d'étudier des maladies neurologiques qui touchent notamment le cerveau. Ces maladies et syndromes seront notamment des maladies psychiatriques, des retards mentaux et des maladies génétiques liées à la douleur. Afin de mener ces études à bien, l'étude anatomique du cerveau, c'est-à-dire de sa constitution interne, est indispensable et en particulier au niveau microscopique.

Le but de ce projet est donc de réaliser des interventions chirurgicales sous anesthésie générale afin de perfuser les animaux sans douleur. Cette technique permet de conserver le cerveau et de pouvoir l'étudier dans de bonnes conditions.

Remplacement:

Pour les études concernant le cerveau, il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux. En effet, il n'existe pas encore de modèle de cerveau *in vitro* ou autre permettant de réaliser de la recherche fondamentale dans ce domaine.

Réduction:

Au cours de ce projet 22 lignées génétiquement modifiées chez la souris et une chez le rat seront utilisées. Un total de 2920 animaux au maximum sera utilisé sur la durée du projet. Pour chaque lignée, les effectifs ont été calculés afin d'avoir un nombre minimal d'animaux tout en ayant des résultats scientifiquement interprétables.

Raffinement:

Aucune douleur n'est attendue. En effet, ces animaux ne feront l'objet que d'une seule procédure et sous anesthésie générale avec les anti-douleurs adaptés.

14112 Les parasitoses comme les filarioses affectent des millions de personnes dans les zones tropicales. Les filaires sont des nématodes parasites de l'homme et de nombreux vertébrés terrestres et sont toujours transmis par des arthropodes hématophages. Le développement filarien comprend classiquement 5 stades. Les stades 1 ou microfilaires sont dans le sang ou le derme et sont prélevés par l'arthropode vecteur pendant un de ses repas sanguins.

Les stades 1 muent en stades 2 puis en stades 3 dans le vecteur. Les stades 3 ou stades infestants sont inoculés dans la peau de l'hôte et migrent de la peau vers leur destination finale (principalement tissus conjonctifs, vaisseaux lymphatiques, système cardiopulmonaire, cavités coelomiques...); là ils muent en stades 4 puis en adultes, mâles et femelles, qui se reproduisent et libèrent des milliers de microfilaires.

Le contrôle des infections filariennes humaines dépend actuellement de stratégies chimiothérapeutiques principalement dirigées contre les microfilaires (= traitements microfilaricides). Le développement de résistance aux traitements actuels et l'absence de vaccin justifient la demande de nouvelles études pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements antifilariens, en particulier sur des modèles animaux de référence. De plus, aucun médicament efficace contre les vers adultes (traitements macrofilaricides) n'est disponible, ce qui retarde la réalisation de l'élimination ou de l'éradication des filarioses. Le processus de découverte et de développement de macrofilaricides reste très difficile.

Des programmes de traitement et de contrôle des maladies filariennes par l'administration massive de médicaments (AMM) sont en place depuis plus de 20 ans. Cependant, les traitements actuels ciblent le ver juvénile (microfilaires) et doivent être répétés pendant 10 à 15 ans dans le cas de certaines filarioses. Par conséquent, il existe un besoin médical pour un médicament qui peut tuer les vers adultes (macrofilaricide) ou les stades 3 ou les stades 4. Un nouveau médicament macrofilaricide à court terme sûr pourrait être utilisé dans le traitement individuel des patients et aider à l'effort d'élimination dans les programmes actuels.

Ce projet présente les étapes nécessaires à la mise en place de tests anti-filariens dans un modèle de filariose chez des rongeurs avec des traitements ciblant soit les stades 4 soit les vers adultes.

La filaire modèle *Litomosoides sigmodontis* ne se développe complètement que chez la souris consanguine BALB/c et la gerbille de laboratoire. Le cycle est meilleur chez la gerbille mais il faut plus de temps pour y observer une microfilarémie

Ces expériences ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives car les filaires ne muent pas *in vitro*. Pour pouvoir tester 500 produits, et afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux tout en ayant une robustesse statistique, ces expériences, réparties sur une durée de 5 ans, seront réalisées sur un nombre maximal de 2800 souris BALB/c pour 420 produits testés et 850 gerbilles pour 80 produits testés.

Les procédures envisagées sont estimées de classe modérée. Les animaux seront étroitement surveillés. Les produits à évaluer ont déjà fait l'objet de tests de toxicité chez les souris et les doses (quantité/nombre) ne doivent pas induire de douleur chez l'animal. Cependant en cas de signes de stress/douleur, des mesures seront mises en place pour les réduire (arrêt/diminution des traitements) et si les points limites sont atteints (perte de poids, prostration, pelage altéré) le projet sera immédiatement stoppé et les objectifs initialement prévus du projet seront réévalués.

Les souris seront maintenues en cage dans le respect de la réglementation (taille des cages, enrichissement, nourriture, soins). Entre autre la surface des cages sera au minimum égale aux recommandations en vigueur, avec eau et nourriture *ad libitum*. Des igloos, bâtons de bois et ouate seront disposés dans chaque cage afin que les animaux construisent notamment son nid.

14113 Le carcinome hépatocellulaire (HCC) est le cinquième type de malignité le plus fréquent dans le monde et constitue la deuxième cause de décès par cancer dans le monde. Seuls 30 à 40% des patients atteints de HCC sont éligibles à des traitements potentiellement curatifs, tels que la transplantation hépatique, la résection chirurgicale, l'ablation par radiofréquence (RFA) ou l'injection d'éthanol percutané (PEI). Un nombre important de cas de HCC sont diagnostiqués à un stade avancé et la survie médiane après le diagnostic est d'environ 6 à 20 mois. Les options thérapeutiques pour les patients présentant un HCC en stade avancé au moment du diagnostic comprennent la chimioembolisation transartérielle (TACE) et / ou une chimiothérapie systémique telle que le sorafénib. Cependant, l'un des principaux inconvénients du traitement par sorafénib est le faible taux de réponse objective. Il est donc très important que nous trouvions des drogues plus efficaces.

Après une étude minutieuse des bases de données et mise au point par nos collaborateurs, un analogue de la trifluopérazine (ZZW-115) a été sélectionné et s'est avéré très efficace sur plusieurs lignées cellulaires dérivées du HCC. Nous avons obtenu des résultats prometteurs *in vitro* en réduisant significativement le taux de prolifération cellulaire. L'efficacité de cette molécule est justifiée par son affinité pour une protéine clé dans le processus de carcinogenèse du foie, NUPR1.

Nous souhaitons injecter des cellules tumorales humaines (Hep3B) dans des modèles de souris immunodéficiente et générer ainsi une xénogreffe soumise à un traitement journalier de manière intra-péritonéale pour garantir l'observance du traitement. Les souris seront légèrement anesthésiées pour faciliter la manipulation et mesurer le poids de l'animal ainsi que la taille de la tumeur tout en diminuant le stress engendré par la piqure.

À terme, les souris seront sacrifiées afin de prélever les tumeurs qui se seront formées durant l'expérimentation.

La règle des 3 R semble respectée puisque

1) nous avons évalué le nombre minimum d'animaux à 16 souris, soit 8 souris pour chaque condition (contrôle 0. 1% DMSO) et 5 mg/kg).

2) nous avons estimé des doses à faible impact neurologiques afin de préserver le bien-être des animaux tout en évaluant l'efficacité de notre molécule.

3) nous avons tenté d'utiliser toutes les alternatives possibles (*in vitro*, *in cellulo* et *in silico*) et parmi les options *in vivo*.

Réduit la douleur des souris pendant les procédures expérimentales (anesthésie, analgésie, critères de jugement adaptés, etc.) qui nous étaient possible de choisir, nous avons décidé d'utiliser le

modele de Xenogreffes nous assurant un nombre minimum de souris et un risque lié à la douleur quasi inexistant comparativement à des modèles d'OGM développant spontanément un cancer.

Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours et une habitude à l'expérimentateur seront assurés. Le raffinement portera également sur les conditions d'hébergement (groupes sociaux, cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum) et l'enrichissement environnemental. Les souris seront hébergées dans des cages contenant des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs et réduire l'ennui, et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, élimination, marquage, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette)

14114 *Pneumocystis jirovecii* est un champignon microscopique spécifique à l'Homme. Il peut causer une pneumonie sévère, la pneumocystose, chez les personnes ayant des défenses immunitaires altérées, tels que les sujets infectés par le SIDA, les patients transplantés d'organe ou encore atteints de cancers. Il représente la deuxième infection fongique invasive la plus fréquente en France. Malgré une prise en charge thérapeutique adaptée, la mortalité est de 20 à 30%. Pour autant, il n'existe pas à ce jour de lien avec une résistance du champignon au traitement.

La pneumocystose est une maladie très inflammatoire. En effet, les lésions pulmonaires observées sont d'avantage reliées à une réponse non contrôlée et inadaptée du système immunitaire qu'à un effet pathogène direct de *Pneumocystis jirovecii*.

Nous émettons l'hypothèse que les mauvaises évolutions de la maladie, malgré un traitement adapté, pourraient être dues à un défaut du processus actif de résolution de l'inflammation, impliquant notamment certains types de lymphocytes et de médiateurs lipidiques.

Depuis sa découverte dans les années 1950, les connaissances sur ce champignon restent limitées car il n'est pas cultivable *in vitro*. La connaissance que nous en avons repose ainsi sur les études cliniques chez l'Humain ou sur les modèles animaux, principalement rongeurs. En effet, il existe des espèces de *Pneumocystis* spécifiques des rongeurs et non transmissibles à l'Homme : *Pneumocystis murina* pour la souris et *Pneumocystis carinii* pour le rat). En cas de déficit de l'immunité, ces rongeurs infectés par le champignon présentent une atteinte pulmonaire très proche de celle observée chez l'Homme.

Le projet a ainsi pour objectif d'étudier les acteurs de la résolution de l'inflammation chez la souris infectée par *Pneumocystis murina*. Il comprend, dans un premier temps, une analyse descriptive de l'inflammation et de sa résolution au cours de l'infection puis une étude interventionnelle avec modification des paramètres qui se seront avérés les plus intéressants.

Ce travail peut être une première étape vers la découverte de nouveaux marqueurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques pour la pneumocystose pulmonaire.

Pour optimiser l'utilisation et la protection des animaux au cours de l'expérimentation dans notre laboratoire, nous prenons en compte de la manière suivante la règle des 3R :

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé a priori en respectant les critères pour une analyse statistique appropriée. Les rongeurs utilisés sont consanguins, de mêmes âge et sexe, réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables.

Lors du sacrifice, les organes ou parties d'organes non requis pour l'expérience en cours, ainsi que le matériel traité non consommé, sont conservés pour d'autres utilisations éventuelles, constituant une bio-banque accessible à l'équipe ou aux collaborateurs, prévenant l'utilisation d'autres animaux.

- Raffinement : Les méthodes d'analyses choisies sont récentes et puissantes, permettant l'étude simultanée d'un grand nombre de paramètres. Ceci conduit à réduire la variabilité expérimentale et le nombre de techniques à réaliser, donc le nombre d'animaux à utiliser.

Le bien-être de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien ou bi-quotidien des animaux, l'aide à l'alimentation (eau et nourriture gélifiés dans la cage) en cas de besoin,

l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage).

Compte tenu de l'évaluation de la réaction inflammatoire dans cette étude, des molécules anti-inflammatoires ne pourront être utilisées. Cependant, la durée des expérimentations est adaptée pour éviter l'apparition des signes de la maladie et si toutefois il était observé une atteinte clinique (prostration, perte de poids, cyanose) les souris seront euthanasiées. L'infection de la souris par le champignon *Pneumocystis* se fait par voie naturelle (respiratoire), sans chirurgie et sous anesthésie légère, pour limiter au maximum la douleur et le stress. En dehors du suivi clinique et de l'entretien hebdomadaire de l'immunodépression, les contentions seront réalisées sous anesthésie afin de limiter le stress de l'animal.

- Remplacement : Du fait de l'absence de culture *in vitro* pour les champignons du genre *Pneumocystis*, le modèle animal *in vivo*, dont le modèle murin, est à ce jour le plus adapté pour l'étude physiopathologique de la pneumocystose.

La responsabilisation du manipulateur et le respect de l'animal nous conduisent à prendre en charge la prévention de la souffrance, notamment par l'application stricte de points-limites préalablement définis.

Le nombre de souris nécessaires pour conduire ce projet est de 2672 souris au total sur une période de 5 ans.

14115 Un nouveau produit d'intérêt (X) va être utilisé dans un protocole clinique de thérapie cellulaire en tant que réactif dans une culture de progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques. Les cellules ont été cultivées avec le produit X selon les méthodes de production spécifiques au client. Ces cellules vont être utilisées comme médicament de thérapie cellulaire pour traiter le cancer lymphoïde humain. Il est nécessaire d'évaluer son potentiel de tumorigénicité dans un modèle murin pour compléter l'étude de tumorigénicité précédente.

Cette nouvelle étude complète les données de sécurité des projets déjà déposés et acceptés.

Le protocole clinique inclura de jeunes patients (moins de 1 an), des deux sexes. La tumorigénicité sera donc évaluée dans des souris des deux sexes mais uniquement âgées de 8 semaines.

La dose du produit de thérapie cellulaire injectée chez la souris correspond de 8 à 10 fois la dose maximale que recevront les patients.

L'objectif principal de l'étude est d'évaluer le potentiel de tumorigénicité des cellules traitées avec le produit X d'intérêt administrées par voie intraveineuse à des souris, afin de disposer de données de sécurité pour démarrer le développement clinique des cellules souches hématopoïétiques avec le produit d'intérêt.

Au total, 20 souris immunodéprimées seront utilisées :

-Groupe 1 : 5M/5F de 8 semaines injectés avec 100 µL de solution contrôle

-Groupe 2 : 5M/5F de 8 semaines injectés avec 100 µL des cellules d'intérêt traitées avec le produit X

Les animaux seront injectés au sinus rétroorbitaire.

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

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

Respect de la règle des 3Rs :

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

Réduction : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum avec un n=5 pour les deux sexes et les deux groupes. Ce chiffre étant le minimum requis pour pouvoir statuer sur le potentiel tumorigène des cellules traitées au produit X étant donné la variabilité interindividuelle.

Les tests statistiques utilisés seront des tests non paramétriques de Mann-Whitney ou une ANOVA à deux facteurs selon la nature des données à analyser avec un $p < 0.05$ pour la significativité.

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

14116 Nous travaillons chez le cheval sur des projets destinés à la filière équine, pour obtenir des résultats immédiatement valorisables. Nous utilisons des animaux de races anglo-arabe, selle français et trotteur français. Il s'agit de produits de souches de juments utilisées et vendues pour des carrières sportives, ce qui rend leur utilisation pertinente pour la filière. Nous avons déjà montré que les poulains nés de juments primipares sont plus petits à la naissance et jusqu'à au moins 18 mois que les poulains issus de juments multipares. De plus, leur métabolisme glucidique est différent de celui des poulains issus de multipares. Comme on sait que l'excès de glucose et d'insuline dans le sang est associé au développement de lésions des articulations (ostéochondrose) chez le poulain, on pourrait avoir plus de lésions d'ostéochondrose chez les poulains nés de primipares, l'ostéochondrose étant un problème qui affecte près de 30% des poulains de sport.

Les travaux qui indiquent que les premiers poulains sont différents ont toutefois des biais importants : il est difficile de séparer l'effet de l'âge de la jument de l'effet de sa parité car les études comparent en général des juments primipares jeunes à des juments multipares plus âgées. Or, on sait dans les autres espèces que la réceptivité utérine peut varier en fonction de la parité et/ou de l'âge, ce qui peut affecter la qualité de l'embryon, sa capacité à développer un placenta efficace et sa santé métabolique à long terme.

La méconnaissance des effets réels de la parité par rapport aux effets de l'âge de la jument sur les performances du poulain nous empêche actuellement de proposer aux éleveurs des stratégies de supplémentation de la jument ou du poulain né de primipare avec des compléments alimentaires adaptés. On ne sait pas non plus s'il est plus judicieux de faire pouliner une jument avant sa carrière sportive ou de ne la mettre à la reproduction qu'à la fin de sa carrière sportive. De plus, comme les effets de la parité de la jument sur les performances du poulain n'ont pas été vraiment évalués, ce paramètre n'est pas pris en compte lors de l'évaluation génétique des animaux.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer de façon indépendante l'effet de la parité chez des juments âgées (10-18 ans) au moment de l'insémination sur :

- 1- la fonction endométriale (analyse histologique)
- 2- les sécrétions de l'utérus qui permettent le développement de l'embryon avant la mise en place du placenta (analyses des acides gras par chromatographie en phase gazeuse, des protéines, des lipides et des métabolites par spectrométrie de masse)
- 3- l'embryon (expression des gènes du développement par séquençage des ARN messagers)

Nous utiliserons 20 juments ainsi qu'un étalon pour obtenir un minimum de 12 embryons (6 par groupe). Toutes les juments utilisées ont un âge compris entre 10 et 18 ans. Ces juments sont conduites en élevage classique. Les juments seront divisées en 2 lots : celles n'ayant jamais pouliné en 2019 (nullipares) et celles ayant déjà pouliné mais n'ayant pas de poulain en lactation au moment de la collecte. Les juments seront caractérisées par leur mesures (poids et hauteur au garrot) et leur note d'état (observation de la jument). Leur alimentation sera mesurée.

Nous suivrons le cycle de reproduction des juments par échographie, nous induirons l'ovulation avec de l'hormone Chorionique Gonadotropine, nous vérifierons par échographie que l'ovulation a bien eu lieu, nous inséminerons les juments, puis nous effectuerons des collectes d'embryons à 8,5 jours après ovulation par la méthode non-chirurgicale utilisée classiquement en élevage (collecte par lavage d'utérus). Avant la collecte, un tampon hygiénique sera inséré pendant 10 minutes dans l'utérus pour collecter le fluide utérin. Après collecte, nous effectuerons une biopsie de l'endomètre. Une prise de sang sera aussi effectuée à chaque collecte. Ces actes ne nécessitent pas de sédation, les animaux sont maintenus dans un travail et la procédure n'est pas douloureuse

(procédure de routine en médecine vétérinaire pour la reproduction des chevaux). Au cas où la jument serait agitée, elle sera tranquilisée avant la procédure.

Les différences entre les groupes pour les analyses histologiques et les analyses des sécrétions utérines seront analysées avec des tests non-paramétriques de permutation. Les résultats de séquençage seront analysés avec le package DESeq2 du logiciel R avec une correction de Benjamini-Hochberg. Cette technique est la méthode couramment utilisée pour ce type d'échantillons. L'utilisation de 6 échantillons par groupe pour ce genre d'analyse est considérée comme suffisante par la communauté scientifique.

Cette étude ne peut être effectuée que sur l'espèce cible (le cheval) et ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives. Les animaux seront conservés sur la ferme après la procédure. Les échantillons prélevés qui ne seront pas complètement utilisés seront mis à la disposition des autres utilisateurs de la ferme.

14117 Nous sommes quotidiennement exposés à des mélanges complexes de composés toxiques présents dans notre environnement. Certains de ces xénobiotiques, en particulier les pesticides, persistent sous forme de résidus avec une bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. L'incertitude subsiste quant aux effets possibles de cette exposition à long terme et à de faibles doses sur la santé humaine. Un certain nombre de données suggèrent que le système nerveux, le système immunitaire et le système reproducteur pourraient être des cibles de plusieurs pesticides. De plus, de récentes recherches épidémiologiques suggèrent un lien entre l'exposition in utero et néonatale aux pesticides et l'incidence de certains déficits ou maladies survenant à l'âge adulte, tels que les troubles de spectre autistique, la maladie d'Alzheimer, ou la sclérose latérale amyotrophique. Préciser la nature et l'ampleur de ce risque est une question importante de santé publique.

Le cerveau est une cible privilégiée des xénobiotiques, plus particulièrement au cours des périodes critiques du développement. En effet, une exposition à ces molécules peut conduire à des dommages importants et permanents sur le fonctionnement cérébral, notamment du fait de la survenue d'un stress oxydatif, d'une génotoxicité et d'une neuroinflammation.

Le but de ce projet est d'étudier les effets neurodéveloppementaux d'un cocktail de xénobiotiques au cours du développement chez la souris. Nous utiliserons deux herbicides organophosphorés, le glyphosate (GLY) et le glufosinate d'ammonium (GLA), et une neurotoxine produite par des cyanobactéries, la β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA). Les effets de ces molécules indépendamment les unes des autres ont récemment montré des effets toxiques sur la neurogenèse après une exposition périnatale ou adulte. Cependant, aucune étude sur le neurodéveloppement ne montre la toxicité d'une exposition combinée à ces xénobiotiques (« effet cocktail ») pourtant présents en simultanément dans notre environnement.

Dans ce projet, nous étudierons les effets neurodéveloppementaux d'une exposition gestationnelle ou postnatale à un cocktail de xénobiotiques sur la descendance chez la souris. Nous nous focaliserons sur la neurogenèse et sur la neuroinflammation au sein des deux niches neurogéniques (zone sous ventriculaire et hippocampe). Des études récentes suggèrent un lien important entre l'activation immunitaire liée à une infection maternelle au cours de la gestation ou à un stress postnatal et l'apparition de dommages cérébraux dans la descendance, dommages similaires à ceux observés après une exposition aux pesticides. Ces données soulèvent la question de l'implication de ces deux composantes (activation immunitaire et environnement) dans les déficits cérébraux observés. Pour cela, nous utiliserons deux modèles murins de sensibilité aux xénobiotiques :

- Un modèle pro-inflammatoire correspondant à une injection unique de LPS à faible dose chez la femelle gestante ou chez le souriceau pour mimer une infection maternelle ou postnatale aiguë
- Un modèle génétique correspondant à des souris déficientes pour la protéine XLF (souris XLF^{-/-}). Cette dernière est un acteur clé dans les mécanismes de réparation de l'ADN de type recombinaison homologue (NHEJ). Ainsi, les souris XLF^{-/-} présentent une instabilité génomique les rendant potentiellement plus sensibles à leur environnement.

Pour les humains, la période préoccupante d'exposition aux pesticides englobe le dernier trimestre de la grossesse jusqu'à l'âge de 18 ans. Par conséquent, dans ce projet visant à reproduire ces types d'exposition humaine, les femelles gestantes seront exposées trois fois par semaine par instillation aux cocktails de xénobiotiques à partir du milieu de la gestation (10^{ème} jour embryonnaire) et les souriceaux trois fois par semaine par instillation à partir de la première semaine suivant la mise bas (5 à 15 jours postnataux). Le traitement au LPS sera réalisé de façon unique au 10^{ème} jour embryonnaire ou à 5 jours postnataux. Les différentes expériences seront réalisées sur les souriceaux mâles et femelles âgés de 5 à 15 jours. Les différents temps d'exposition et d'analyses postnatales correspondent à des temps importants dans le neurodéveloppement chez la souris. Les animaux mâles non utilisés seront conservés jusqu'à l'âge adulte pour une analyse comportementale.

Au cours des différentes expériences sur les souriceaux, un suivi des différentes populations de cellules souches neurales (CSN) des niches neurogéniques et des cellules impliquées dans la neuroinflammation (principalement l'activation microgliale) sera réalisé par immunofluorescence et par cytométrie en flux pour mieux comprendre le ou les mécanismes impliqués. Des études *ex vivo* permettront d'analyser les capacités de différenciation, de migration et de clonogénicité des CSN. Le suivi de la progression du cycle cellulaire basé sur des injections successives d'analogues de nucléotides (EdU et de BrdU), largement utilisé au laboratoire, permettra de quantifier les cellules ayant progressées dans le cycle cellulaire. Les analyses comportementales postnatales et chez l'adulte seront en accord les études précédemment réalisées.

Le nombre minimum nécessaire d'animaux pour que les résultats de ce projet puissent être analysés statistiquement a été déterminé. Ce projet nécessitera un maximal de 432 femelles gestantes, de 2592 souriceaux et 24 souris mâles NMRI (souris stimulus pour le comportement adulte). Ce nombre a été réduit au minimum pour ne pas compromettre la validité des expériences. L'ensemble des animaux sera utilisé pour toute la durée de l'étude (5 ans).

A ce jour, aucune méthode *in vitro* ou *in silico* n'existe pour modéliser la complexité du cerveau et l'ensemble des processus physiologiques survenant au cours du développement du cerveau. Le modèle rongeur a été retenu car sa neurogenèse présente de nombreuses caractéristiques communes à l'ensemble des mammifères. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation (en groupe dans un milieu enrichi). Les animaux, nés et élevés dans des élevages agréés, disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes et l'apparition d'une souffrance éventuelle. L'application de critères d'arrêts nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

14118 Le développement d'un nouveau médicament est long et complexe. Une part importante du développement repose sur la détermination de la posologie qui garantira une efficacité maximale tout en minimisant au maximum d'éventuels effets indésirables.

Dès lors, il est primordial de caractériser le devenir d'une molécule après administration dans un être vivant. L'étude de ce comportement définit la pharmacocinétique (PK) de la molécule. Celui-ci se découpe en 4 phases : absorption, distribution, métabolisation et élimination.

Les données PK ainsi générées, couplées aux données d'efficacité (ou données pharmacodynamiques (PD)) permettront de déterminer le plus précisément possible le régime posologique qui sera affecté aux études cliniques.

En accord avec les recommandations réglementaires internationales, il est également nécessaire de documenter, au préalable des études cliniques, ces propriétés pharmacocinétiques chez l'animal.

Objectif du projet: Les procédures présentées dans ce projet ont pour but de caractériser la PK d'une molécule après application topique ou après administration par voie systémique (exemple : voie orale, veineuse ou sous cutanée) unique ou répétée chez le miniporc. Cette caractérisation se fera par le biais de mesures de la concentration de la molécule au niveau plasmatique et/ou

tissulaire et permettra de déterminer la biodisponibilité du produit administré en support du choix de la voie d'administration utilisée dans les études de toxicologie.

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent d'évaluer le profil PK et l'activité PD *in vivo* de nouvelles molécules en lien avec un mécanisme d'action. Les données obtenues contribueront au profilage, à la sélection de molécules, au choix de la voie d'administration utilisée dans les études de toxicologie et au choix des doses à utiliser chez l'Homme pour les indications thérapeutiques.

Domages escomptés: Certaines molécules testées pourraient présenter un effet toxique, particulièrement en cas d'administrations répétées. Le cas échéant, le directeur d'étude, en collaboration avec le vétérinaire, décidera de la suspension ou de l'arrêt du traitement, et d'entamer un protocole analgésique pour pallier à toutes douleurs.

Dans le cas de thérapies à visée dermatologiques, le prélèvement de biopsies cutanées à différents intervalles de temps pourra être réalisé afin d'évaluer la cinétique des concentrations de la molécule dans la peau. Lorsque nécessaire, une suture est réalisée, la cicatrisation est suivie quotidiennement et associé à un protocole analgésique adapté.

La sélection de points limites appropriés et l'utilisation d'un produit analgésique (si jugé nécessaire par le directeur d'étude et/ou le vétérinaire en charge du bien-être des animaux) seront prévues dans ce projet.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu offrant une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de pharmacocinétique et pharmacodynamie adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Méthode de raffinement :

Un même animal pourra être utilisé au sein de plusieurs études après accord du vétérinaire pour tester différentes molécules, formulations ou voies d'administration. Pour cela une période de réversibilité devra être respectée. Cette période correspond à la période durant laquelle le produit ayant été administré est totalement éliminé par l'organisme.

-Choix des espèces: L'espèce miniporc est choisie en raison des nombreuses similitudes physiologiques et anatomiques (notamment au niveau de la peau) avec l'Homme. Cette similarité morphologique est essentielle pour mimer la pénétration cutanée d'un point de vue pharmacocinétique. L'utilisation du miniporc permettra de transposer les expositions systémiques et tissulaires ainsi que les activités pharmacologiques aux résultats attendus dans les études cliniques.

L'espèce miniporc est également sélectionnée en raison de l'adaptabilité de l'espèce pour ce type d'étude, notamment la possibilité de réaliser des prélèvements sanguins répétés et des biopsies sur le même individu après administration unique et répétées. De plus cette espèce est utilisée dans les études de toxicologie en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence des outils d'analyses *ex vivo* spécifiques de ces espèces.

- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est ajusté en fonction des objectifs de l'étude, du type et du nombre d'analyse et est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet.

Afin d'avoir des résultats robustes, il est nécessaire d'avoir 3 animaux par condition expérimentale.

Sur une période de 5 ans, il est estimé à 4400 le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation des procédures expérimentales, la formation et le maintien des gestes techniques.

Afin de réduire le nombre d'animaux, l'effort sera porté sur la possibilité de réutiliser un même animal, après avoir respecté une période de réversibilité adaptée, afin d'évaluer d'autres molécules/formulation et/ou d'autres voies d'administration, et avec l'accord du vétérinaire.

Ce nombre pourra également être diminué s'il est prouvé statistiquement, qu'un ou deux animaux suffisent par condition.

- Les conditions d'hébergement et de soins utilisés ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes. Les animaux sont hébergés en enclos individuel, sur copeaux de bois, tout en gardant un contact visuel et olfactif avec leurs congénères. Ce milieu environnemental sera enrichi, par l'apport de jouets spécifiques, afin que l'animal reproduise au mieux son environnement naturel.

Dès leur arrivée, une période d'acclimatation, d'au moins 15 jours, sera appliquée afin qu'ils s'habituent aux conditions d'hébergement, à la présence humaine et appréhendent les différents gestes et situations auxquels ils seront soumis pendant l'étude.

Afin de s'assurer du bien-être animal, une observation quotidienne sera faite en tenant compte des points-limites préalablement définis. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en appliquant des protocoles analogiques pré établis.

14119 La pancréatite chronique est une maladie inflammatoire chronique du pancréas. Elle peut engendrer des complications importantes avec la destruction du parenchyme pancréatique menant à une insuffisance pancréatique exocrine et un diabète. C'est également un facteur de risque du cancer du pancréas.

Nous allons tester si un traitement aux neuropeptides Orexines des souris génétiquement modifiées Sox9-CreER ; Hnf1bfl/fl permet de réverser la pancréatite chronique que ses souris développent spontanément.

Nous travaillons sur la souris car le modèle murin a un double intérêt : (1) répondre à notre problématique par l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés (2) associer les phénotypes de ces animaux avec les pathologies humaines (développement et physiologie comparable). Les procédures seront réalisées dans les meilleures conditions possibles afin de limiter les procédures invasives et de conserver au maximum le bien-être de l'animal, en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Ce projet se déroulera sur une période de 2 ans dans des locaux agréés et nécessitera un nombre total de 45 animaux. La conformité avec les exigences de remplacement, réduction, et raffinement est prise en compte : 1) remplacement : les connaissances issues de cette étude sur l'animal ne peuvent pas être actuellement obtenues par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la régénération et du développement du cancer du pancréas, nous obligeant à travailler à l'échelle d'un organisme. Des études sur cellules en culture sont également prévues pour compléter cette partie d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer ; 2) réduction : nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables (5 à 10 par sous-groupe) et 3) raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Les animaux sont placés dans des portoirs ventilés, dans des conditions contrôlées de température et d'hygrométrie. Les souris sont placées dans des cages regroupant maximum 5 individus, avec accès à l'eau et à la nourriture « ad libidum », avec litière et enrichissement (copeaux de carton et accessoires tels que boule, tunnel, abris...). Le changement des litières est effectué une fois par semaine.

La procédure d'injection de l'orexine aux souris sera effectuée par injection en intrapéritonéal sur animal vigile et n'induit pas de souffrance des animaux. Le suivi des animaux est quotidien et des mesures de surveillance sont mises en œuvre, en surveillant plusieurs caractéristiques des souris en expérimentation, telles que leur apparence et leur comportement, et si nécessaire leur poids. Aucun prélèvement ne sera réalisé au cours de l'élevage des souris. L'effet de l'orexine sur le pancréas des souris sera analysé après l'euthanasie des animaux et dissection du pancréas.

14120 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui survient avec l'âge et qui affecte presque 8% des personnes de plus de 60 ans. La maladie se caractérise par une difficulté à initier les mouvements et s'avère très invalidante pour les patients et leur entourage. Un traitement existe pour cette maladie (L-Dopa), mais il occasionne des effets secondaires qui deviennent très invalidants après seulement quelques années de traitement. Il y a donc des recherches actives pour trouver de nouveaux traitements permettant de freiner l'évolution de la maladie et ainsi en diminuer

les symptômes. Dans la littérature scientifique, la vitamine A, une vitamine indispensable présente dans les produits animaux, apparaît comme pouvant jouer un rôle important dans la maladie de Parkinson, mais les mécanismes sont encore peu connus. Avec l'âge, l'organisme métabolise moins bien la vitamine A, ce qui conduit à une carence en vitamine A pour les organes cibles, tels que le cerveau. Ainsi, la carence en vitamine A survenant avec l'âge pourrait être un facteur de risque important pour le développement de la maladie de Parkinson.

Notre projet vise à comprendre comment une carence de vitamine A peut engendrer les déficits moteurs caractéristiques de la maladie de Parkinson. Pour cela, des rats carencés ou non en vitamine A seront entraînés pendant plusieurs semaines dans une tâche motrice complexe qui permet de modéliser très finement les altérations motrices caractéristiques de la maladie de Parkinson. La motivation des animaux à apprendre et effectuer cette tâche est suscitée par une récompense qui est de l'eau sucrée. Pour que les rats soient motivés par cette récompense, ils ont un accès restreint à l'eau dans la journée, mais la quantité d'eau reçu par jour est de 15 ml, ce qui respecte les besoins des animaux. Cette tâche est très puissante, ce qui permet d'obtenir de nombreux résultats concluants sur les apprentissages et comportements moteurs des rats. L'impact d'un traitement à la L-Dopa sera également étudié chez ces animaux.

Dans ce projet, nous veillerons à respecter la règle des 3R:

- Remplacement: ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée étudiant l'impact de la nutrition sur le comportement, il n'existe donc pas de méthode alternative ou substitutive adaptée aujourd'hui. Les cellules en culture ne forment pas de réseaux de neurones représentatifs de la réalité biologique et nous n'avons pas encore suffisamment de données pour utiliser des modèles informatiques. De plus, les approches expérimentales sont trop invasives pour être effectuées chez l'Homme.

- Réduction: Un nombre de 75 animaux par groupe a été déterminé comme étant le minimum requis pour atteindre une puissance statistique suffisante. Nous aurons 3 groupes qui différeront par leur régime : contrôle ; carencé en vitamine A ; carencé puis enrichi en vitamine A. Ceci représente 225 rats pour un projet d'une durée de 5 ans.

- Raffinement: Les rats seront hébergés par paire avec un congénère et ils bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leur cage. Leur état de santé sera vérifié quotidiennement et ils seront pesés une fois par jour pour surveiller la prise de poids. Les animaux seront manipulés quotidiennement par les expérimentateurs pour réduire leur niveau de stress pendant les entraînements et tests de comportement. Malgré toutes les précautions prises, si un animal présente des points limites à un moment de l'étude, comme une diminution du poids de plus de 20%, il sera euthanasié pour éviter toute souffrance.

Cette étude de recherche fondamentale apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans la maladie de Parkinson et pourra ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter la maladie et/ou en ralentir la progression.

14121 La lamproie marine est un poisson migrateur amphihalín, c'est-à-dire qui effectue une partie de son cycle biologique dans l'océan (phase de grossissement) et l'autre partie en eau douce (phase de reproduction). Elle fait partie depuis 1992 des espèces prioritaires d'intérêt communautaire de l'Union Européenne qui doivent être protégées au titre de la biodiversité et elle est inscrite sur la liste rouge des espèces menacées en France par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Les principales menaces recensées sur cette espèce sont l'entrave à la libre circulation (difficulté d'accès aux frayères du fait des barrages présents sur les cours d'eau) et la dégradation potentielle de l'habitat nécessaire à la reproduction. Par ailleurs, de nombreuses observations récentes faites, notamment par les pêcheurs (professionnels et amateurs), indiquent que cette espèce serait une proie privilégiée par le silure (*Silurus glanis*), le plus gros prédateur d'eau douce connu en France et très présent sur notre bassin. De nombreux suivis sont mis en place depuis ces dernières années pour suivre l'état des populations (comptages sur frayères ainsi qu'au niveau de stations de contrôle et suivi de l'efficacité de la reproduction). Or, depuis presque 6 ans, l'ensemble de ces indicateurs est à la baisse, et tend vers un constat de situation alarmante

de la population. Des suivis complémentaires doivent donc être mis en place afin d'évaluer le comportement d'un échantillon de la population préalablement équipé d'émetteurs radio et acoustiques et comprendre la réelle problématique rencontrée. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'appréhender les raisons de la baisse de ces indicateurs en analysant précisément la migration de l'espèce sur le bassin (rythme, zones de repos et de reproduction fréquentées, front de colonisation) grâce à la radiotélémétrie en prenant en compte notamment les paramètres environnementaux (débit température, habitat). Un zoom particulier sera réalisé sur le taux de prédation de l'espèce avant la période de reproduction grâce à l'implantation d'un tag acoustique spécifique permettant de signaler en temps réel si l'individu suivi est toujours l'individu marqué initialement (lamproie marine) ou s'il s'agit de son prédateur (silure), ce tag changeant de code en cas de digestion. Les résultats de cette étude devront favoriser la mise en place de mesures de gestion destinée à pérenniser cette espèce à haute valeur patrimoniale.

Règle des 3 R (Remplacer - Réduire - Raffiner) :

- Remplacement : Il n'est pas possible dans cette opération d'appliquer la règle du remplacement d'espèce, puisque l'objet est de suivre l'espèce cible, la lamproie marine.
- Réduire : Le nombre d'individus utilisé dans cette expérimentation permet de s'affranchir des risques liés aux paramètres environnementaux.
- Raffiner : Les individus marqués sont capturés par des pêcheurs professionnels la veille des opérations de marquage, placés en stabulation un temps réduit avant le marquage (≤ 18 h), sédaté lors de la manipulation, surveillés pendant l'opération et la phase de réveil qui s'effectue dans un bassin alimenté en permanence par l'eau du fleuve où ils sont gardés à minima 1h.

Ainsi, toutes les manipulations seront mises en place afin de réduire au maximum le stress des poissons. Les individus seront pêchés par un pêcheur professionnel grâce à des bourgues (nasses) installées dans le cours d'eau. Une fois les individus capturés, ils seront :

- soit placés dans un bassin alimenté en permanence par l'eau de la rivière (pompe) afin d'assurer une bonne oxygénation de l'eau, bassin couvert pour laisser les individus dans l'obscurité et ainsi limiter le stress.
- soit laissés dans des nasses accrochées au bateau du pêcheur (ou ponton) avec au maximum, 5 individus par nasse. La lamproie étant un animal très robuste, ce mode de stabulation est adapté et souvent utilisé par les pêcheurs.

Le choix de la stabulation se fera en fonction des possibilités qu'offrent le site de marquage, sachant que la priorité est de ne pas transporter les individus.

Chaque individu est sédaté avant la pose des émetteurs radio et acoustiques. Pendant cette phase, le personnel surveille le comportement général de la lamproie, notamment la respiration. La règle qui recommande que le poids total des marques représente un faible pourcentage du poids de l'animal (2 %), dans le cadre du bien-être animal est respectée. Les lamproies sont surveillées pendant la phase de réveil, en vérifiant la ventilation et le retour rapide à un comportement normal, notamment, pour cette espèce, une fixation sur la paroi du bassin à l'aide de la ventouse buccale.

Les lamproies ainsi marquées sont gardées à minima 1 heure en bassin de réveil puis relâchées délicatement dans la rivière au droit de la zone de marquage. 2 axes de migration étant à étudier, 3 sites de lâchés ont été choisis afin de prendre en compte l'ensemble des caractéristiques naturelles et anthropiques des cours d'eau. Ainsi, 2 lâchés auront lieu sur chaque axe en limite de marée dynamique, zones à partir desquelles les individus sont susceptibles de se reproduire. Sur un des axes où le facteur pêche semble pregnant, 1 lâché supplémentaire sera effectué en aval de la pêcherie.

Au total, 3 opérations de marquages comprenant à chaque fois 1 échantillon de 30 individus seront réalisées chaque année afin de s'affranchir de risques liés aux paramètres environnementaux (crue notamment) et de réduire au maximum le nombre de lamproies utilisés tous les ans tout en obtenant des données suffisamment robustes et statistiquement fiables pour appréhender le comportement de cette espèce lors de la migration. Ainsi, 90 individus par an seront utilisés, soit sur 5 ans, 450 lamproies. Ce nombre de poissons sera suffisant pour analyser les données acquises et est

cependant très faible au regard des populations présentes sur le bassin. Les données de pêches sur les 5 dernières années évoquent le nombre de 50 000 à 70 000 individus capturés sur l'ensemble du bassin sur lequel sera réalisé le projet.

14122 Le cancer du pancréas sera la 2ème cause de mortalité par cancer en 2030. Le stade précoce de la maladie est cliniquement silencieux et le diagnostic tardif contribue à un taux de survie à 5 ans de seulement 8%. Il est urgent de mieux comprendre les bases moléculaires de l'initiation de la maladie afin de concevoir une meilleure approche pour une intervention précoce. Nous nous intéressons au rôle de l'histone désacétylase 3 (HDAC3), un facteur dit « épigénétique » qui permet de réguler l'expression des gènes. Nous recherchons l'implication d'HDAC3 et les mécanismes moléculaires impliqués dans la régénération du pancréas et dans l'initiation des lésions précancéreuses. Ce projet devrait donc permettre de découvrir de nouvelles régulations moléculaires du maintien des cellules du pancréas et des mécanismes initiateurs des stades précoces du cancer, pouvant constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous travaillons sur la souris car le modèle murin a un double intérêt : (1) répondre à notre problématique par l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés (2) associer les phénotypes de ces animaux avec les pathologies humaines (développement et physiologie comparable). Les procédures seront réalisées dans les meilleures conditions possibles afin de limiter les procédures invasives et de conserver au maximum le bien-être de l'animal, en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Ce projet se déroulera sur une période de 3 ans dans des locaux agréés et nécessitera un nombre total de 115 animaux. La conformité avec les exigences de remplacement, réduction, et raffinement est prise en compte : 1) remplacement : les connaissances issues de cette étude sur l'animal ne peuvent pas être actuellement obtenues par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la régénération et du développement du cancer du pancréas, nous obligeant à travailler à l'échelle d'un organisme. Des études sur cellules en culture sont également prévues pour compléter cette partie d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer ; 2) réduction : nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables (5 par sous-groupe) et 3) raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. La procédure d'injection de tamoxifène et de céruléine aux souris n'induit aucune souffrance manifeste des animaux et sera effectuée par injection en intrapéritonéal sur animal vigile. Le traitement à la céruléine sera associé pendant 2 jours à l'utilisation d'un antalgique. Un suivi quotidien des souris (évaluation de l'état général, aspect de la peau, comportement) sera effectué. Aucun prélèvement ne sera réalisé durant l'élevage des souris avant l'euthanasie pour dissection du pancréas.

14123 Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau caractérisée par un renouvellement excessif et anormal de l'épiderme se traduisant par la formation de plaques érythémateuses et de squames. Cette dermatose inflammatoire est fréquente puisque 2 à 5% de la population européenne est atteinte. L'Organisation Mondiale de la Santé décrit le psoriasis comme « une maladie chronique, non transmissible, douloureuse, défigurante et invalidante, pour laquelle il n'y a pas de guérison, et qui a un impact négatif important sur la qualité de vie des patients ». De fait, s'il est rarement mortel, le psoriasis crée souvent un réel handicap dans la relation du patient avec lui-même et avec les autres. Les traitements actuellement disponibles, en particulier pour les formes légères, permettent une diminution des symptômes et une amélioration de la qualité de vie. Néanmoins, ceux prescrits pour les formes les plus sévères (immunosuppresseurs, anticorps monoclonaux) présentent des effets secondaires importants, ne sont pas efficaces chez tous les patients et enfin, leur efficacité diminue avec le temps. La recherche biomédicale doit donc proposer des solutions thérapeutiques innovantes. Malgré des années de recherche, l'étiologie du psoriasis est encore mal comprise. Il est néanmoins connu que c'est une maladie multifactorielle mêlant prédispositions génétiques, facteurs environnementaux et auto-immunité. En outre, l'inflammation chronique est un acteur central des mécanismes physiopathologiques impliqués. Tout agent

capable de moduler ces phénomènes immunitaires sera un candidat-médicament de choix pour le traitement du psoriasis. Nous avons développé au laboratoire un tel candidat.

Parmi les étapes clés du développement d'un nouveau médicament figure l'évaluation de son efficacité thérapeutique (phase préclinique). Cette étape nécessite des analyses rigoureuses sur des cellules en culture (*in vitro*) et chez l'animal (*in vivo*). Nous avons d'ores et déjà réalisé les expériences *in vitro* et obtenu des données préliminaires *in vivo* (en collaboration avec une société de recherche contractuelle) qui tendent à montrer que le composé d'intérêt est aussi efficace pour combattre la composante inflammatoire dans le psoriasis. En outre, les expériences *in vivo* sont un jalon indispensable pour la réalisation des essais cliniques chez l'Homme. C'est pourquoi le modèle murin est central dans ce projet. Il va permettre de tester *in vivo* dans un modèle murin de psoriasis, l'efficacité thérapeutique du candidat médicament, formulé ou non dans des vésicules. En effet, les applications par voie topique sont confrontées à la fonction barrière du stratum cornéum, couche superficielle de la peau. Par conséquent, afin d'optimiser les effets de notre candidat, nous l'avons formulé dans des vésicules pour améliorer son passage au travers du stratum cornéum.

Cette étude comporte deux parties et nécessitera 840 animaux. La première sera dédiée à évaluer l'efficacité thérapeutique de la molécule (seule ou formulée pour favoriser le passage transcutané) et la dose permettant un effet optimal (360 souris). Si la molécule est efficace, nous étudierons dans une deuxième partie les mécanismes cellulaires qui sous-tendent cet effet (480 souris).

Ce projet se base sur des résultats d'expériences réalisées *in vitro* ainsi que plusieurs preuves de concept de l'efficacité du composé dans des modèles murins de maladies inflammatoires chroniques. De plus, il s'inscrit dans la logique et le respect de la règle des « 3R » :

Remplacer: le développement d'un nouveau médicament nécessite une phase préclinique, pré requis obligatoire pour la première utilisation chez l'Homme. Le psoriasis étant une pathologie complexe (action concertée de plusieurs acteurs cellulaires), il est difficilement modélisable *in vitro* ou *ex vivo*. De fait, notre projet nécessite des expériences chez l'animal.

Réduire: en fonction des résultats obtenus dans la partie 1, nous pourrions choisir de poursuivre ou non avec la partie 2. Dans le but de définir au mieux le nombre d'animaux à utiliser, nous avons calculé à l'aide d'un test de puissance, le nombre minimal de souris à inclure par groupe (n=10) pour mettre en évidence une différence significative entre les traitements. De plus, l'expérience et le savoir-faire technique que nous avons acquis au cours des précédentes preuves de concept *in vivo* que nous avons réalisées, nous permettent d'optimiser chaque animal en quantifiant de multiples paramètres.

Raffiner: du coton sera disposé dans les cages comme objet enrichissant. Le modèle que nous avons choisi pour modéliser le psoriasis chez le rongeur est de courte durée et la surface d'induction des lésions est assez faible. Néanmoins, pour diminuer le stress et/ou la souffrance, nous mettrons en place des mesures spécifiques: i) les animaux seront acclimatés aux expérimentateurs et aux différents gestes pendant 8 jours avant le début des expériences, ii) au cours des procédures expérimentales, l'observation et la pesée des souris seront quotidiennement réalisées, et iii) une attention particulière sera apportée à l'état général des animaux (tremblement, posture prostrée). Dans le but de ne pas leur infliger des souffrances trop importantes, nous avons définis des points limites précoces (posture voûtée ou prostrée, poils hérissés, salissures) / amaigrissement (perte de 20% du poids) / absence de toilettage et diminution de l'appétit / anomalies de la respiration (rythme et mouvements) / stéréotypies et hyperactivité (prurit, léchage) / détection d'une anomalie (écoulement, plaies, inflammation)). Les animaux qui atteindraient un de ces points seront immédiatement euthanasiés.

14124 La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche 0.3% de la population et plus de 1% des plus de 60 ans, la maladie débutant habituellement entre 45 et 70 ans. En France 160 000 personnes sont traitées pour la maladie de Parkinson et plus de 20 000 nouveaux cas apparaissent chaque année. Cette maladie neurodégénérative chronique affecte le système nerveux central et entraîne progressivement des troubles moteurs : mouvements ralentis, tremblements, rigidité puis des troubles cognitifs. Ses

causes sont mal connues mais les symptômes moteurs cardinaux sont la conséquence de la perte en neurones dopaminergiques de la substance noire et d'une atteinte des faisceaux nigro-striés. La principale thérapeutique par administration de L-DOPA, un précurseur de la dopamine, améliore les signes cliniques cardinaux du patient mais ne stoppe ni ne ralentit la perte neuronale et donc la progression de la maladie. Il est donc essentiel de comprendre le mécanisme neurodégénératif afin de développer des approches thérapeutiques curatives.

A l'heure actuelle, l'un des principaux mécanismes fortement suspecté de jouer un rôle clef dans la mort neuronale au cours de la maladie de Parkinson est l'agrégation d'une protéine appelée alpha-synucléine (aSyn) au sein des neurones qui dégènèrent. Si les raisons de son agrégation restent mal connues, de nombreuses études montrent que les agrégats pathologiques d'aSyn se propagent progressivement dans le cerveau des malades et altèrent plusieurs fonctions cellulaires fondamentales.

L'objectif de ce projet est de caractériser et définir le rôle des anomalies mitochondriales en lien avec l'agrégation neuronale de la protéine aSyn au cours de la maladie de Parkinson (MP). Les mitochondries sont les organelles cellulaires responsables de la production énergétique indispensable à la vie. L'activité de ces organelles serait perturbée dans les neurones qui dégènèrent au cours de la MP mais la cause et les conséquences de cette perturbation restent mal connues. Plusieurs observations suggèrent d'une part que l'agrégation de l'aSyn pourrait en soit provoquer un dysfonctionnement des mitochondries et que d'autre part, une altération mitochondriale pourrait favoriser l'agrégation de l'aSyn. Ce lien bidirectionnel formerait ainsi une boucle d'amplification des mécanismes pathologiques. Cette boucle constitue donc une cible thérapeutique potentiellement intéressante et importante mais qui doit être testée et validée. Pour 1) tester cette hypothèse et 2) comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous proposons d'étudier l'impact de l'agrégation neuronale de l'aSyn sur l'altération des paramètres morphologiques, fonctionnels et moléculaires mitochondriaux dans un modèle expérimental de la MP chez la souris, obtenu par administration stéréotaxique cérébrale d'agrégats préformés d'aSyn. A travers ce projet, nous espérons également obtenir des informations précieuses concernant les mécanismes moléculaires misent en jeu et qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques intéressantes et innovantes pour l'avenir.

Type d'animaux :

Souris mâles adultes (10-12 semaines)

Nombre d'animaux :

Nous estimons utiliser 220 souris.

Respect de la règle des 3R (Remplacement-Réduction-Raffinement) :

Remplacement:

Ce projet est réalisé dans le cadre d'une vaste coopération européenne réunissant une dizaine d'équipes de recherche académiques et de l'industrie pharmaceutique ayant formé un large consortium regroupant de multiples expertises, notamment dans le domaine de la culture cellulaire et du développement et l'utilisation de modèles de cellules souches induites humaines (iPSCs). Ces modèles *in vitro* constituent un axe fort du projet et leur étude apporteront des éléments précieux qui permettront de réduire au maximum l'utilisation d'animaux. Toutefois, l'agrégation de l'aSyn est un processus chronique et progressif qui se propage à travers des réseaux neuronaux connectés et dans un contexte particulier d'inflammation cérébrale orchestrée par de nombreuses cellules non neuronales. Cette complexité cellulaire et organisationnelle est difficilement modélisable *in vitro*. Toutefois, afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux vertébrés (souris), le consortium utilisera également des modèles *in vivo* chez le vers nématode *C. elegans* et chez la mouche (*Drosophila*). Ces modèles invertébrés seront utilisés notamment en première intention pour tester les nouvelles cibles moléculaires identifiées au cours du projet permettant ainsi de limiter le nombre de candidats testés ultérieurement chez le modèle souris.

Réduction: Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des

effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

(Utilisation d'un logiciel en accès libre pour de calcul de puissance statistique).

Raffinement: toutes les mesures pour réduire la douleur et la souffrance des animaux ont été prises lorsque les impératifs scientifiques le permettaient (chirurgie en condition aseptiques strictes et sous anesthésie, antalgiques pré et post-opératoire, hébergement contrôlé et enrichi aux maximum des possibilités, temps d'acclimatation et de récupération respectés).

14125 Le parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infecte tous les animaux à sang chaud, incluant l'homme et la souris, et est responsable de la toxoplasmose. Chez l'homme, la toxoplasmose est une maladie opportuniste qui peut se manifester par une inflammation du cerveau chez les sujets immunodéprimés ou des malformations chez le fœtus en cas de transmission materno-fœtale. Des études récentes suggèrent un lien entre l'infection par ce parasite et le développement de maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques.

Après ingestion d'aliments souillés par des parasites (sous forme de kystes), la prolifération du parasite au cours de l'infection aiguë est normalement asymptomatique chez l'homme. Cependant, dans le règne animal, une réponse inflammatoire intestinale localisée au site d'entrée du parasite (intestin grêle) peut être observée. Ensuite, la dissémination vers le cerveau et la conversion en une phase 'dormante' (kystes) correspond à l'établissement de la phase chronique, potentiellement responsable de l'inflammation du cerveau. Dans les 2 phases, les réponses immunitaires sont primordiales mais elles ne suffisent pas à éliminer le parasite de l'organisme et celui-ci peut persister dans le cerveau, la rétine et les muscles. A ce jour, il n'existe pas de vaccin commercialisé contre *T. gondii* chez l'homme. Les seules stratégies à la disposition du personnel médical reposent sur le diagnostic et le suivi des patients immunodéprimés et des femmes enceintes, conduisant le cas échéant en une prise en charge thérapeutique par un traitement médicamenteux et éventuellement une interruption médicale de grossesse.

Au-delà de ces aspects, des études réalisées chez le rat suggèrent que l'infection chronique par *T. gondii* puisse également provoquer des altérations du tissu intestinal, à la fois sur le compartiment épithélial mais aussi sur le système nerveux entérique.

De ce fait, l'objectif du projet est d'évaluer si l'infection chronique par le parasite *Toxoplasma gondii* a une influence sur la santé digestive, et en particulier sur l'homéostasie du tissu intestinal. Les quatre paramètres majeurs regardés seront la perméabilité de la barrière intestinale, la motricité intestinale, l'inflammation et la douleur viscérale. Pour répondre à ces questions centrées sur l'interaction intestin / parasite, le recours au modèle animal est indispensable. Le modèle animal choisi est la souris, qui constitue un hôte intermédiaire naturel de *T. gondii*.

Pour optimiser l'utilisation et la protection des animaux au cours de l'expérimentation dans notre laboratoire, nous répondons à la règle des 3R dans ses différents aspects :

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé a priori en respectant les critères pour une analyse statistique appropriée. Les rongeurs utilisés sont consanguins, de mêmes âge et sexe, réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Lors du sacrifice, les organes ou parties d'organes non requis pour l'expérience en cours, ainsi que le matériel traité non consommé, sont conservés pour d'autres utilisations éventuelles, constituant une bio-banque accessible à l'équipe ou aux collaborateurs, prévenant l'utilisation d'autres animaux.

- Remplacement : Bien qu'il existe des méthodes alternatives (cellules intestinales en 2D et en 3D ou des explants que nous pouvons infecter par *T. gondii*) le recours à l'expérimentation animale est indispensable pour ce projet essentiellement basé sur des expériences de physiologie intestinale (perméabilité, motricité, douleur) qui nécessitent obligatoirement le recours à l'animal.

- Raffinement : Les méthodes d'analyses utilisées, les plus avancées, permettent d'obtenir une précision dans les mesures conduisant à réduire la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux utilisés. Il en est de même pour les stratégies expérimentales, pour lesquelles certains protocoles permettent de réduire la variabilité expérimentale (par exemple, l'utilisation de souris modifiées génétiquement par rapport à des souris sauvages ayant subi une déplétion). Le bien-être

de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'aide à l'alimentation en cas de besoin, l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage).

La responsabilisation du manipulateur et le respect de l'animal nous conduisent à prendre en charge la prévention de la souffrance, notamment par l'application stricte de points-limites préalablement définis. En cas de signes externes de souffrance (cachexie, prostration, hypothermie, poils hérissés) persistant pendant plus de 24h, les animaux seront euthanasiés.

Il sera nécessaire de respecter un délai de 24h avant d'euthanasier un animal car le développement d'une réponse immunitaire permet souvent une amélioration rapide et une résorption des symptômes initiaux.

Selon la souche de souris et le type de parasite utilisés, une pesée quotidienne ou hebdomadaire sera réalisée, et une perte de poids de 20% constituera un point-limite. Le nombre de souris nécessaire pour conduire ce projet est de 1020 souris sur 5 ans.

14126 La dermatite atopique (DA) est une maladie cutanée inflammatoire chronique dont l'incidence a triplé dans les pays industrialisés. Elle touche 15 à 20% des enfants et 1 à 3% des adultes. La DA est généralement associée à d'autres manifestations atopiques telles que l'allergie alimentaire, la rhinite allergique et l'asthme. La pathologie de la DA est complexe et multifactorielle. Des facteurs environnementaux, génétiques et immunologiques conduisent à une défaillance de la barrière cutanée permettant l'entrée d'allergènes et un dérèglement du système immunitaire. Elle se caractérise par un assèchement cutané, l'apparition d'érythèmes et des démangeaisons entraînant un épaississement de la peau. Ces manifestations sont généralement localisées au niveau du cou, du visage, des poignets, des mains et des pieds. En raison de l'affaiblissement de la protection cutanée, la DA est associée à de multiples complications comme une surinfection microbienne des lésions cutanées, des infections virales et fongiques. Les démangeaisons sont également à l'origine de troubles du sommeil chez deux tiers des patients entraînant des déficits d'attention ou l'hyperactivité chez les enfants et de l'anxiété et la dépression chez les adultes. En plus des symptômes physiques, les patients souffrant de DA présentent un défaut d'estime de soi, une gêne vis-à-vis de leur apparence ayant un impact négatif sur leur vie sociale.

Il est donc important de pouvoir disposer de modèles expérimentaux permettant une meilleure compréhension et analyse des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la DA. Ces modèles sont également la base pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques visant à améliorer la santé des personnes souffrant de DA.

Lorsque cela est possible, les candidats médicaments sont évalués sur culture cellulaire ou tissu isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Cependant la complexité de cette maladie nécessite encore de pouvoir faire la preuve de concept et d'efficacité dans un organisme intégré comme l'animal. Un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques du domaine.

Les modèles illustrés dans ce protocole sont des modèles de référence dans l'étude de la dermatite atopique. Ils consistent à induire une dermatite atopique par sensibilisation à *Aspergillus fumigatus*, ovalbumine ou encore par application de DNFB permettant d'étudier respectivement les réactions allergiques d'origine alimentaire, respiratoires ou cutanées. Ces protocoles sont pratiqués chez la souris. Les animaux seront hébergés selon les conditions de la réglementation 2010/63 avec enrichissement (nidification et igloos). Les animaux seront suivis quotidiennement après induction de la pathologie. Leur douleur sera évaluée selon des critères de poids, d'apparence physique et comportementaux (un score de 8/14 engendra l'arrêt immédiat de l'expérimentation). Nous prévoyons d'utiliser un nombre maximum d'animal de 486 animaux par an soit 2430 animaux sur la totalité de l'étude.

14127 L'insuffisance rénale aigüe est une pathologie fréquente mêlant à la fois un risque vital immédiat, et un risque de maladie rénale chronique qui représente un problème de santé publique.

L'épuration extra rénale (EER) constitue l'une des pierres angulaires de sa prise en charge thérapeutique, dont les modalités de mise en œuvre sont débattues. Nous avons montré en clinique humaine qu'une stratégie d'initiation de l'épuration extra rénale d'attente (= réservée à des critères d'urgence) au cours de l'insuffisance rénale aiguë permettait d'éviter l'épuration extra rénale dans plus de 50 % des cas, avec une mortalité similaire, par rapport à une stratégie d'initiation précoce. Nous avons aussi constaté que cette stratégie d'attente était associée à une probable meilleure récupération rénale que chez les patients ayant été épurés d'emblée, amenant à proposer le concept de lésions rénales induites par l'épuration extra rénale.

Notre objectif est de confirmer expérimentalement l'hypothèse de lésions rénales induites par l'épuration extra rénale au cours de l'insuffisance rénale aiguë, et d'en étudier les mécanismes.

Nous souhaitons donc mettre au point un modèle animal d'hémodialyse de rat après agression rénale aiguë d'origine septique par LPS (lipopolysaccharide), l'hémodialyse étant testée comme « second hit » au cours de l'agression rénale.

Afin de distinguer les effets de chaque agression, certains rats ne recevront que l'une d'entre elles (LPS ou EER) et d'autres rats recevront l'une (LPS) puis l'autre (EER). Des périodes de récupération seront prévues entre les deux agressions et après la deuxième. Enfin, un groupe de rat fera l'objet d'une procédure SHAM.

Pour cela, nous prévoyons d'utiliser 80 rats SpragueDawley (8 groupes de 10 rats).

Il s'agit du nombre minimal estimé d'animaux nécessaires pour étudier notre hypothèse, afin de satisfaire au mieux au principe de réduction.

Ainsi, 40 rats recevront une injection intra péritonéale de LPS, puis une cathétérisation et ligature de l'artère carotide et de la veine fémorale (n = 10 rats), éventuellement associée à une circulation extra corporelle (n = 10 rats), ou à une mise en contact avec membrane de dialyse (n = 10 rats), ou à une hémodialyse complète (n = 10 rats).

40 autres rats subiront les mêmes procédures sans avoir été exposés préalablement au LPS.

Afin de garantir le bien-être animal et respecter le principe de raffinement, les animaux seront hébergés dans des cages ventilées avec un enrichissement tel que des morceaux de bois pour leur permettre de ronger et des billes de cellulose pour les obliger à les déployer pour faire des nids. Les expérimentations seront les plus courtes possibles (mise à mort 48h maximum après le début du protocole, durée minimale pour évaluer l'apparition de lésions rénales engendrées par les 2 procédures). Une anesthésie est prévue lors des procédures de cathétérisation, épuration extra rénale et ligature des vaisseaux.

Une surveillance pluri-quotidienne du bien être animal, ainsi qu'une analgésie optimale est aussi prévue dans cette optique pendant les phases d'attente entre chaque procédure. Le nombre d'animaux a été calculé de sorte à respecter la règle des 3R. Dans notre projet, il est difficile d'envisager des méthodes de remplacement car l'étude des effets de la dialyse ne peut pas se faire *in vitro* sur des lignées de cellules rénales et impliquerait des gestes bien trop invasifs pour une étude clinique chez les patients.

14128 Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez les primates non-humains pour des candidats médicaments dont l'administration sera réalisée par perfusion intraveineuse avec implantation de cathéter.

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

Ces études peuvent avoir plusieurs objectifs :

- évaluation précoce du profil toxicologique du candidat médicament : établir quels sont les organes cibles et les doses toxiques pour un organisme vivant.
- recherche des mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposition des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice et réduire le risque à utiliser ces médicaments

- détermination du profil pharmacocinétique et sélection des molécules ayant les meilleurs profils parmi une série de molécules, ou comparaison du profil lors d'un changement de formulation ou de sel de la molécule
- comparaison des paramètres pharmacocinétiques de différentes formulations et/ou sels de molécule, pour vérifier la bonne exposition et permettre ainsi d'évaluer l'efficacité et la toxicité dans les études ultérieures,
- ajustement des doses et/ou du schéma expérimental des essais précliniques
- aide à l'interprétation des données pharmacologiques et toxicologiques

Les primates non-humains (macaques cynomolgus) ne sont utilisés que si les autres espèces non-rongeurs ne permettent pas de répondre aux objectifs du projet en tenant compte des éléments suivants:

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

L'implantation de cathéter(s) vasculaire(s), réalisée au préalable selon les règles de l'art, avec un protocole d'anesthésie/d'analgésie adapté au cas par cas, permet l'administration unique ou répétée par perfusion intraveineuse. L'implantation de cathéter vasculaire peut également permettre des prélèvements sanguins répétés, lorsque cela n'est pas incompatible avec les objectifs de l'étude. Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1 jour à 4 semaines, elles incluent des observations cliniques, prise de température corporelle (mesure rectale), des prélèvements sanguins pour mesure du taux de médicament dans le sang et/ou vérification des paramètres hémato-biochimiques, examens cardiologiques (ECG), mesure de la pression artérielle ainsi que des examens ophtalmologiques. Des collectes d'urine sur des durées inférieures ou égales à 24h peuvent être également effectuées via des entonnoirs placés sous les unités d'hébergement. Pour mener à bien ces études, il peut être nécessaire de manipuler les animaux sur une très courte durée ; les animaux sont régulièrement entraînés à ces manipulations et des procédures de renforcement positifs (récompenses) sont régulièrement mises en œuvre.

Certains animaux pourront être réutilisés si les conditions sont conformes à la réglementation. Les autres animaux sont sacrifiés en fin d'étude pour identifier les organes qui pourraient être l'objet d'effets adverses. Le nombre d'animaux utilisé dans ces études préliminaires est inférieur à celui des études réglementaires et est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude. Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle du vétérinaire désigné, afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter ainsi toute souffrance inutile.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement des candidats médicaments en évaluant très précocement leur toxicité éventuelle (réduction ainsi du nombre d'études réglementaires) et en ajustant au mieux le choix des doses et le schéma expérimental des études ultérieures de sécurité et d'efficacité (diminution des contraintes pour l'animal dans les études réglementaires. Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation « *in vivo* », un maximum de 30 PNH sera utilisé chaque année (dont des animaux réutilisés), donc un maximum de 150 (en 5 ans) pour le projet.

14129 Le fer est un élément essentiel pour les organismes vivants. Il est impliqué dans des mécanismes physiologiques indispensables à la vie tels que la synthèse de l'hémoglobine. L'absorption du fer dans le duodénum est étroitement régulée en fonction des besoins. D'autre part, il n'existe pas de système actif d'excrétion du fer. L'hepcidine, petit peptide sécrété par le foie, a un rôle clé dans la coordination de l'utilisation et du stockage du fer et adapte l'entrée du fer aux besoins de l'organisme. Elle agit en se liant à la ferroportine, un exportateur de fer en surface des cellules intestinales et des macrophages, cellules immunitaires spécialisées dans le recyclage cellulaire.

Cette liaison induit la dégradation de la ferroportine. Sa disparition inhibe l'efflux de fer des cellules intestinales et des macrophages, provoquant une diminution du fer dans l'organisme.

Dans ce contexte, plusieurs projets de recherche seront développés :

1) Identification de la cible d'une protéine hépatique essentielle dans le métabolisme du fer. Des mutations dans le gène codant pour cette protéine conduisent chez l'homme à une maladie génétique caractérisée par une anémie sévère. Toutefois son mécanisme d'action reste méconnu. Dans ce projet, nous nous attacherons à le caractériser.

2) Les maladies génétiques résultant en une surcharge en fer comme l'hémochromatose, les thalassémies et les syndromes myélodysplasiques, ou résultant en une anémie comme les maladies inflammatoires chroniques affectent des millions de personnes dans le monde. La surcharge en fer en particulier dans le foie conduit si elle n'est pas traitée à des fibroses hépatiques, cirrhoses et des hépatocarcinomes. L'anémie, quant à elle, est un facteur aggravant de toutes les maladies chroniques. Le facteur commun de ces maladies est une dérégulation de l'expression de l'hepcidine. La matriptase-2 est un inhibiteur de l'hepcidine, et inhiber ou augmenter son activité permettrait de stimuler ou inhiber l'expression de l'hepcidine et ainsi moduler l'absorption intestinale de fer. Dans ce projet, diverses molécules agissant sur la matriptase-2 seront testées pour leur capacité à corriger la surcharge en fer ou l'anémie dans des modèles murins adaptés.

3) Rôle du fer dans la pathologie du NAFLD. La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) est une maladie fréquente touchant 14% à 27% de la population dans les pays industrialisés. Elle représente un problème majeur de santé à l'échelle mondiale. Cette stéatose non alcoolique peut être isolée ou associée à une inflammation, et peut progresser vers une hépatite non alcoolique (NASH). Cette hépatite peut évoluer en fibrose et, puis, en cirrhose et cancer du foie. Actuellement, il n'existe pas de traitement pour inverser la stéatose et éviter l'évolution en NASH. De plus, une augmentation du fer hépatique est associée à un mauvais pronostic pour les patients NAFLD. En effet, les niveaux d'hepcidine dans l'urine, le sérum et le foie sont plus élevés chez les patients NAFLD présentant un excès de fer. D'un point de vue thérapeutique, l'élimination du fer par saignées améliore l'évolution de la maladie chez ces patients. Toutefois, cette approche a de nombreux désavantages, notamment car elle provoque l'anémie chez les patients traités. De nouvelles solutions sont donc nécessaires. Dans ce projet de recherche, nous évaluerons le rôle du fer dans la sévérité de cette maladie et nous développerons des outils thérapeutiques afin de diminuer l'expression de l'hepcidine et ainsi réduire l'accumulation hépatique de fer observée dans cette pathologie.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous utiliserons 2830 souris sur 5 ans à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Mann-Whitney), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules/doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté dans chaque procédure.

Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement) : 1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes dans la régulation du métabolisme du fer. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduisent pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et donc ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents pour l'humain. 2- Réduction : les expériences sont organisées afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Des études préliminaires nous ont permis de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons déjà validé certaines de nos approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris permettent d'acquérir des données fiables. Les rongeurs utilisés sont consanguins et de même âge réduisant la variabilité entre animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables. 3- Raffinement : Le bien-être animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi quotidien des animaux, l'enrichissement de leur environnement (coton afin qu'ils puissent faire un nid) et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). De

plus, une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée avant expérimentation. Après une procédure expérimentale impliquant une ouverture de la peau, ou un traitement pouvant impliquer un traumatisme, l'administration d'analgésiques, d'antalgiques ou d'anti-inflammatoires, risquent d'interférer avec les résultats. Néanmoins, nous avons mis en place des critères d'arrêt par rapport à la souffrance potentielle des souris comme la perte de poids, l'activité extrême, la prostration, l'aspect ou l'absence de toilettage et la diminution de l'appétit. Si l'un de ces critères est atteint, l'expérimentation est immédiatement arrêtée et les souris sont mises à mort.

14130 Notre projet consiste à étudier le devenir d'un biomatériau cellularisé in-vivo. Notre biomatériau permet de créer un environnement tridimensionnel pour les cellules souches issues du tissu adipeux afin d'étudier leurs propriétés de cicatrisation/régénération, en particulier dans des pathologies encore difficilement prises en charge par les thérapeutiques actuelles : les parodontites (inflammation des tissus qui entourent et qui soutiennent les dents). Dans l'optique d'un essai clinique de régénération du parodonte chez l'Homme (ensemble des tissus de soutien des dents), il est indispensable de comprendre le devenir de ce biomatériau seul mais également cellularisé, d'estimer les effets bénéfiques aussi bien que de recueillir des données de sécurité concernant sa tolérance in-vivo. Le but de ce projet est donc d'étudier l'évolution du biomatériau (dégradation ou maintien au cours du temps, colonisation par les cellules de l'hôte, réaction immunitaire) ainsi que l'évolution des cellules implantées (survie, prolifération, mort cellulaire...).

Le biomatériau avec ou sans cellules a déjà été étudié in-vitro générant un maximum de données pertinentes pour la clinique. Cependant, aucun modèle in-vitro n'existe pour étudier la réponse immunitaire de l'hôte, les signaux systémiques, la migration des différents types cellulaires après greffe. Un organisme entier est donc indispensable : il n'y pas de remplacement possible du modèle animal. Afin de faire une étude approfondie du biomatériau et des cellules d'intérêt, nous utiliserons des souris immunocompétentes (pour estimer les effets systémiques et immunitaires avec un biomatériau murin) et des souris immunodéprimées (permettent de tester des biomatériaux contenant des cellules humaines en évitant le phénomène de rejet).

Pour réaliser ce projet, nous envisageons donc de travailler sur deux souches de souris. L'étude, en 5 temps différents, intégrera 1 groupe d'animaux greffés avec le biomatériau cellularisé et 1 groupe contrôle d'animaux greffés avec le biomatériau sans cellules. Nous analyserons le devenir des biomatériaux selon 2 modalités d'exploration différentes. Une même souris sera utilisée à la fois pour l'étude du biomatériau implanté ainsi que pour l'étude de la biodistribution des cellules greffées au niveau de l'organisme entier. Ainsi le nombre de souris est réduit à son minimum nécessaire sans compromettre les objectifs du projet et permettant un traitement statistique optimal des données récoltées.

Le nombre de souris utilisées dans ce projet sera de 1080.

Nous apporterons une attention particulière au raffinement et respect du bien-être animal. En effet, à la réception les animaux seront acclimatés à leur nouvel environnement, puis seront hébergés au nombre de 4-5/cages permettant le respect du caractère grégaire de la souris. Nous proposons également d'enrichir l'environnement des souris, notamment avec du coton, favorisant la nidification et le bien-être animal. De plus, la surveillance des souris sera quotidienne et permettra ainsi de repérer et d'atténuer toute forme de douleur ou de souffrance pour l'animal.

La règle des 3R est respectée :

- Remplacement du modèle animal jusqu'à présent par des modèles d'étude in-vitro
- Réduction du nombre d'animaux à son minimum (utilisation d'un seul groupe contrôle quand cela est possible, nombre de souris minimum mais suffisant pour les analyses statistiques)
- Raffinement par une attention particulière aux souffrances de l'animal et à son bien-être (observations quotidiennes, administration d'antalgique si besoin, anesthésie, hébergement amélioré par de l'enrichissement, ...)

Les points limites sont établis par l'observation quotidienne des animaux : perte de poids supérieure à 20%, ulcération/infection à l'emplacement de la greffe, si l'animal ne fait plus sa toilette ou s'il

n'interagit plus avec ses congénères. Si un de ces points limites est observé et qu'aucune action ne peut permettre d'améliorer rapidement son état, l'arrêt de l'expérimentation sera réalisé.

14131 Pendant des milliers d'années, les humains ont consommé moins de 5 g de fructose par jour. Au 19^{ème} et 20^{ème} siècles la baisse du prix du sucre et la conversion industrielle du glucose en sirops de maïs à haute teneur en fructose à l'échelle mondiale a entraîné une augmentation drastique de la consommation de sucre ce qui a multiplié par un facteur 40 la consommation de fructose. Cependant plus de 50% de la population adulte et 80% des enfants de moins de 5 ans ne peuvent pas absorber complètement une charge de 25 g de fructose, alors que l'apport quotidien moyen est de 40 g. Ainsi, les changements dans les habitudes alimentaires ont créé des conditions de malabsorption du fructose. Or le fructose apparaît de plus en plus comme un facteur de risque pour le développement de troubles fonctionnels cérébraux (apparition de troubles cognitifs, émotionnels). Cependant les mécanismes liant fructose et troubles de l'humeur demeurent inconnus. Nous avons montré que la consommation excessive de fructose de par la malabsorption à laquelle elle est associée entraîne de profondes modifications du microbiote intestinal. Or le microbiote intestinal est de plus en plus reconnu comme étant impliqué dans les troubles de l'humeur. Nous émettons l'hypothèse que des modifications du métabolisme du microbiote induites par l'ingestion de fructose pourraient donc participer indirectement au développement de troubles de l'humeur.

L'objectif de notre projet est d'explorer l'effet de la malabsorption du fructose sur l'apparition de troubles émotionnels de type anxiété et dépression. Pour cela deux modèles de souris présentant un défaut d'absorption du fructose (les souris KHKKO et GLUTKO) ainsi que des souris ne présentant pas cette altération (souris dites sauvages WT) seront utilisées. Le projet comprend une procédure permettant d'évaluer l'état d'anxiété et de dépression en réponse à une malabsorption du fructose. Les souris (hébergées en cage individuelle) recevront un régime contenant 20% (20F) ou 0% (0F, régime témoin) de fructose. 20 souris par groupes seront utilisées. Nous avons montré au préalable que 6 semaines étaient suffisantes pour induire un changement du microbiote chez les souris présentant un défaut d'absorption du fructose exposées à un régime contenant du fructose. Après 6 semaines de régime, les souris seront soumises à une série de tests permettant d'évaluer leur état d'anxiété et de dépression : au total pour ce projet nous aurons besoin de 120 souris (40 souris GLUT5KO, 40 Souris KHKKO et 40 souris WT) sur 3 ans. En plus des tests comportementaux, le poids et la prise alimentaire des souris seront vérifiés 3 fois par semaine. Les points limites établis pour décider de la sortie des animaux du protocole seront la perte de poids supérieure à 20% et un comportement anormal (tel que prostration et l'apathie). Après réalisation des tests de comportement les souris seront maintenues 1 semaine sous régime 20F ou 0F puis elles seront euthanasiées. Au moment de l'euthanasie un prélèvement de sang sera effectué, suivi post-mortem par les prélèvements de différents tissus pour des analyses biologiques, histologiques et moléculaires. Cette étude de relation entre les bactéries du microbiote et l'hôte ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Elle nécessite donc l'utilisation d'animaux. Le nombre d'animaux prévu est le minimum nécessaire pour effectuer des tests statistiques corrects (20 animaux par lot) sans nécessité de répétition ultérieure de l'expérience. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout d'un abri obscur en polycarbonate. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

14132 D'après l'OMS, le diabète de type II concernait plus de 422 millions d'individus dans le monde en 2014 et ce nombre continue d'augmenter. En 2015, 1,6 million de décès sont directement attribués au diabète de type II et 2,2 millions supplémentaires à l'hyperglycémie (taux de sucre trop important dans le sang).

Les personnes souffrant de diabète de type II font face à une diminution de leur qualité de vie et elles présentent des risques augmentés de survenue d'accidents cardiovasculaires. Des mesures hygiéno-diététiques comme une prise en charge nutritionnelle adaptée couplée à une activité physique sont des mesures efficaces de prévention de ces maladies. Le recours à des médicaments

comme la metformine sont des mesures complémentaires à ces mesures hygiéno-diététiques lorsque la maladie a atteint un stade plus avancé. L'utilisation d'extraits végétaux en complément des mesures hygiéno-diététique est également une piste sérieuse pour la lutte contre l'obésité et le diabète de type II. Certains extraits végétaux issus de la pharmacopée européenne ont déjà montré des effets bénéfiques et protecteurs sur le microbiote intestinal et pourraient permettre d'améliorer la qualité de vie et de diminuer les facteurs de risques de développer un diabète de type II.

L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention et le développement du diabète de type II dans différents modèles murins et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces extraits végétaux.

Chez la souris et le rat, il est possible d'induire un état de prédiabète en nourrissant les animaux avec un régime riche en graisse et en sucres (mimant les mauvaises habitudes alimentaires impliquées en partie dans le développement du diabète de type II chez l'homme) durant plusieurs semaines. Un diabète de type II plus sévère peut être obtenu en ayant recours à des souris présentant un déficit en récepteur à la leptine (hormone impliquée dans la prise alimentaire).

Ce projet de type nutritionnel nécessitera l'utilisation de 340 souris et 70 rats sur une durée de 3 ans. Ce nombre est choisi de manière à obtenir les réponses attendues en ayant recours à des effectifs les plus petits possible. Pour cela le projet se base sur la littérature scientifique existante, utilise des outils de calcul statistique (a priori et a posteriori) et privilégie les méthodes non terminales permettant les suivis longitudinaux des animaux. Les modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in silico*, bien que très utiles sur certains aspects et indispensables au principe de remplacement, ne permettent pas encore d'obtenir une approche globale aussi complexe que celle du diabète et de l'obésité chez un mammifère, pour approcher au plus près de la réalité retrouvée chez l'homme. Pour obtenir une première approche globale dans ce projet, l'utilisation de modèles murins de petite taille (souris et rats) est cependant privilégiée aux plus grandes espèces plus susceptibles de ressentir de la douleur sur une plus longue période. Au cours de ce projet, les animaux seront placés dans un environnement adapté à leurs besoins physiologiques et observés quotidiennement sur la base de critères comportementaux (posture, appétit, interaction avec l'environnement...) et morphologiques (croissance, prise de poids, état général des dents, du poil...) pour prévenir au plus vite de la diminution de leur état de bien-être. Les différents tissus obtenus au cours de ce projet seront stockés pour permettre des analyses ultérieures et éviter de devoir recourir à un projet similaire dans le temps.

L'ensemble de ces dispositions favorisent le principe de réduction, raffinement et remplacement de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

14133 -Contexte :

L'une des caractéristiques les plus marquantes de la réponse au stress cellulaire est la phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 (eIF2-a). Cette phosphorylation impacte de nombreuses fonctions cellulaires, comme la synthèse des protéines, l'expression des gènes, le trafic membranaire, l'autophagie et l'apoptose. Toutefois, en fonction du type de cellules étudiées, les facteurs de stress et la phosphorylation d'eIF2-a peuvent induire spécifiquement différentes fractions d'un programme d'expression génique global, qui ne sont pas toujours équivalentes et peuvent aboutir à des résultats physiologiques complètement différents. Ces différents programmes transcriptionnels sont connus collectivement comme la réponse intégrée au stress (ISR).

-Objectif scientifique :

Notre laboratoire a démontré l'importance de la phosphorylation d'eIF2-a sur la production de cytokines lors de la détection d'agents pathogènes par les cellules immunitaires innées. Ces résultats soulèvent d'importantes questions globales sur le rôle de la phosphorylation d'eIF2-a et de la régulation de l'ISR dans la réponse immunitaire.

PROCEDURE 1

La préparation de cellules dérivées de moelle osseuse ou de rate de souris nous permettra de tester le rôle de nos molécules d'intérêt dans l'autophagie et le stress réticulaire.

PROCEDURE 2

La mise en place du modèle de Lupus a pour but de tester la sensibilité hépatique et l'implication de nos molécules d'intérêt.

PROCEDURE 3

La génération du modèle GADD34 flox/flox liée à l'expression de TFP1 fluorescente permettra l'étude du rôle de GADD34 et de eIF2-a dans la sensibilité hépatique et la signalisation immunitaire.

-Retombées attendues :

Nous proposons de répondre à ces questions en appliquant des stratégies expérimentales de biologie cellulaire et d'immunologie utilisant des souris génétiquement inactivées pour les gènes clefs de ces voies de régulation.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

REMPACEMENT

Une grande partie de cette étude sera menée *in vitro* sur des lignées cellulaires immortalisées. Toutefois, il est nécessaire de confirmer les résultats de cette étude avec des cellules primaires obtenues à partir d'animaux ou de tester nos observations au niveau de l'organisme entier *in vivo* (souris) afin de se rapprocher des conditions physiologiques réelles et potentiellement pourvoir effectuer un transfert clinique chez l'homme.

REDUCTION

Le nombre d'animaux utilisé sera également réduit grâce à la mutualisation des techniques et analyses sur un même animal. De plus, de par notre expérience, nous avons pu déterminer le nombre de souris nécessaires à notre étude en tenant compte des éventuelles pertes suite aux différentes procédures.

RAFFINEMENT

La mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel ainsi que le suivi quotidien de l'état de santé des animaux permettront le raffinement de ce projet.

Dès lors qu'un animal aura atteint un point limite énoncé dans le 3. 4. 13, la souris sera euthanasiée dans le but de réduire toute douleur, souffrance et angoisse des animaux. De plus, dans la Procédure 1, aucune intervention aura lieu *in vivo* et le sacrifice aura lieu par dislocation cervicale ce qui réduit notablement toute douleur, souffrance et angoisse des animaux.

Nombre total d'animaux inclus dans le projet :

En conclusion, un nombre total de 710 souris C57BL/6 J sera utilisé lors de ce projet.

14134 Les maladies pulmonaires sont généralement associées à une inflammation des voies respiratoires. Parmi les plus graves on trouve la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO).

La FPI est caractérisée par une détérioration progressive des tissus conduisant à une inflammation généralisée et à la formation de cicatrices pulmonaires. Cette pathologie entraîne une insuffisance respiratoire à l'issue fatale. Elle affecte environ 5 millions de personnes dans le monde, et son taux moyen de survie est de 3 à 5 ans avec un âge moyen de début de 66 ans (75% ont plus de 65 ans). De nombreux facteurs de risque sont décrits, à commencer par la fumée de cigarette, les maladies de reflux gastro-œsophagien, ou certains agents infectieux. Si les risques sont identifiés, les causes sont encore inconnues. Le diagnostic de la fibrose est souvent difficile. Il nécessite la corrélation de plusieurs observations issues des examens physiques et de l'historique physiopathologique précis du patient, parfois associés à une biopsie pulmonaire ou à un lavage broncho-alvéolaire. Aucun traitement n'est actuellement disponible pour la FPI. Seuls certains médicaments sont utilisés pour freiner l'avancée de la maladie, mais ils ne sont que de faible efficacité. L'ultime recours est la greffe pulmonaire mais ne permet, en cas de succès, qu'un léger rallongement de l'espérance de vie.

La BPCO est caractérisée par une inflammation pulmonaire provoquant des lésions tissulaires et un rétrécissement des voies aériennes rendant la respiration difficile. Actuellement 64 millions de personnes ont une BPCO, et 3 millions de personnes en sont mortes. L'OMS prévoit que la BPCO deviendra la troisième cause de décès dans le monde en 2030. Le tabagisme est le principal facteur de risque, on estime que 40 à 50% des personnes ayant fumé toute leur vie développeront une BPCO. Comme pour la FPI, il n'existe aucun traitement curatif de la BPCO. La prise en charge de cette pathologie comprend la réduction des facteurs de risque, notamment la tabagisme et l'utilisation de bronchodilatateurs pour aider à prévenir les exacerbations.

Ces pathologies étant incurables, il est donc nécessaire de pouvoir évaluer, sur des modèles physiologiques intégrés, l'impact de nouveaux candidats pharmacologiques ou cellulaires pour mieux traiter ces pathologies. La complexité de ces maladies, dont la composante est à la fois multicellulaire et humorale, nécessite de pouvoir faire la preuve de concept et d'efficacité dans un organisme intégré comme l'animal. L'objectif de ce projet est de re-créeer les pathologies observées chez l'Homme en utilisant 3 modèles différents chez la souris. La fibrose pulmonaire sera induite par inhalation de bléomycine, un antibiotique entraînant une toxicité pulmonaire. Dans un deuxième protocole, les animaux inhaleront de la fumée de cigarette afin déclencher une BPCO. Le troisième protocole consistera à induire un emphysème pulmonaire par inhalation d'élastase. Les molécules à tester ou les cellules souches mésenchymateuse utilisées en thérapies cellulaires seront administrées en curatif ou préventif. Ce projet prévoit 90 souris par an soit 450 animaux sur la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères définis par l'AFSTAL, d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire) et comportementaux (souris prostrée, agressivité) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé (au-delà d'un score de 8 selon les critères détaillés dans les procédures expérimentales) pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation. Certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience, telle qu'une perte de poids trop importante ou la suffocation de l'animal.

14135 Ces dernières années, l'importance du microbiote intestinal (MI) en santé humaine a été révélée. Celui-ci dégrade les composés alimentaires non digérés dans l'intestin grêle en particulier les fibres. Lorsque ces composés alimentaires apportent un bénéfice santé pour l'hôte ils sont considérés comme prébiotiques. Leurs effets passent par un enrichissement et une diversification du MI, mais également par la production de métabolites bactériens influençant la physiologie de leur hôte. Parmi ces métabolites les acides gras à chaîne courte et en particulier le butyrate exercent un rôle essentiel pour la muqueuse colique. En effet, ils constituent une source énergétique pour l'épithélium colique et renforcent la barrière intestinale. Le butyrate exerce également des effets anti-inflammatoires qui ont été démontrés dans des modèles cellulaires mais également dans les modèles d'inflammation chez le rongeur et qui permettent d'expliquer certains effets bénéfiques de la consommation de fibres.

Un de nos partenaires industriels a identifié un composé (composé A) qui dans des expérimentations *in vitro* en bioréacteur permet d'obtenir une production accrue de butyrate. On peut donc faire l'hypothèse qu'*in vivo*, chez la souris, si cette augmentation importante de la production de butyrate est confirmée, ce composé pourrait donc présenter un intérêt majeur en exerçant des effets anti-inflammatoires et donc être considéré comme un prébiotique. Notre

expérimentation a donc comme objectif de comparer les effets de son administration à ceux classiquement obtenus par le butyrate lui-même.

Les souris seront soumises à une molécule chimique le DSS (dextran sulfate sodium) qui administré à 3% dans l'eau de boisson pendant 7 jours induit une inflammation aigue. Les souris soumises au DSS pendant 7 jours recevront soit aucun autre traitement (témoin positif d'inflammation), soit du butyrate administré dans l'eau de boisson à 150 mM à partir de J2, une dose documentée pour induire les effets anti-inflammatoires voulus, (témoin de l'effet thérapeutique du butyrate). Trois autres groupes recevront du DSS puis à J2 recevront le composé A ajouté à l'eau de boisson à trois concentrations (150, 300, et 750 mM). Deux groupes ne recevront pas de DSS, l'un sera le témoin de l'ensemble de l'expérience, l'autre recevra du butyrate à 150 mM dans l'eau de boisson, afin de pouvoir analyser l'effet du butyrate seul sur l'épithélium colique. Ce lot complémentaire permettra d'analyser l'impact du butyrate sur une muqueuse saine.

Chaque groupe sera constitué de 12 souris Balb/C, réparties à 4 par cage, soit 84 animaux au total.

Le poids des souris sera pris tous les jours (une perte de poids est signe de l'établissement de l'inflammation). Au moment de l'euthanasie (J7) un prélèvement de sang sera effectué, suivi post-mortem par les prélèvements de différents tissus pour des analyses biologiques et histologiques. Cette étude de l'effet du composé A sur l'inflammation nécessite l'utilisation d'animaux car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle qui pourrait permettre d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués *in vitro* ni de les modéliser *in silico*. Le modèle in-vitro a déjà été testé avec succès, il est désormais incontournable de passer par la phase in-vivo. Le modèle d'inflammation induite par le DSS est le modèle préclinique classiquement utilisé pour valider des effets anti-inflammatoires. Le nombre d'animaux prévu permet d'effectuer des tests statistiques (12 animaux par lot) sans nécessiter de répétition ultérieure de l'expérience. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout d'un abri obscur en polycarbonate. Les souris seront 4 par cage pour éviter l'isolement. Les manipulations seront réalisées par du personnel habilité et expérimenté. Le suivi quotidien du poids des souris et de leur comportement constituent les points limites de l'expérimentation (prise ou perte de poids excessive par rapport au poids de départ). Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

14136 Au niveau des aménagements hydroélectriques, des dispositifs de dévalaison sont construits pour protéger les poissons dévalant et pour les transférer sans dommage à l'aval des prises d'eau. Le système de transfert prend généralement la forme d'une conduite se terminant par une chute dans la rivière. Or, les conditions de réception dans la rivière doivent être mieux définies parce qu'on peut observer des arrêts de migration à ce niveau. Le projet consiste à tester différentes conditions de réception des poissons, lors du franchissement d'une prise d'eau ou d'un barrage par des exutoires ou par un ouvrage évacuateur.

Le projet comporte (1) des tests in situ, réalisés avec des juvéniles dévalants de saumon atlantique de pisciculture, (2) des tests in situ et en laboratoire réalisés avec des modules sensoriels appelés « Sensorfish » (capsule équipée de capteurs de pression, de rotation et d'accélération), ainsi que (3) une étude hydraulique menée en laboratoire sur la pénétration des jets dans le matelas d'eau à l'aval. L'objectif de ce projet est non seulement de définir de nouveaux critères hydrauliques garantissant la réception des poissons sans dommage, mais aussi, d'identifier les valeur-seuils des différents paramètres enregistrés par les modules sensoriels Sensorfish, au-delà desquels les dommages sur les poissons apparaissent, afin de pouvoir les utiliser à l'avenir pour vérifier les bonnes conditions de réception, sans recours à des animaux (remplacement).

Les tests in situ sont prévus sur 9 sites, avec à chaque fois deux débits différents examinés pour étudier plusieurs conditions hydrauliques, soit 18 tests au total.

Chaque test « poissons » consistera à attacher, un par un, 100 juvéniles dévalants de saumon de pisciculture à une canne à pêche via un hameçon (inséré dans la bouche sous anesthésie générale), à les relâcher dans le dispositif de dévalaison, puis à les récupérer une fois qu'ils retournent dans la rivière à l'aval. Les poissons seront ensuite libérés de leur hameçon et observés pour déceler les dommages (écaillage, lésion, opercule abîmé...), puis gardés 48h dans des bacs

alimentés en permanence en eau de la rivière afin d'évaluer la mortalité différée. Un lot témoin sera également constitué (100 individus) pour évaluer, lors de chaque test, l'effet des conditions de stockage et de manipulation. Au total, 3600 poissons seront donc nécessaires pour le projet.

L'utilisation de Sensorfish doit nous permettre à terme de ne plus utiliser d'animaux pour ce type d'étude. Cependant, pour pouvoir remplacer l'usage du poisson par le Sensorfish dans les futures vérifications d'innocuité des voies de dévalaison, nous sommes obligés de mener les tests sur les poissons vivants et, en parallèle, sur le module sensoriel Sensorfish. Pour réduire la douleur et le stress des individus utilisés, l'implantation de l'hameçon sera faite sous anesthésie. L'ardillon de l'hameçon sera bloqué par une rondelle de caoutchouc et coupé avant détachement de l'hameçon. Les conditions de stabulation seront soignées et surveillées (circulation d'eau, ombrage). Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, en cas de dommages graves sur les 50 premiers individus du lot test, l'expérimentation ne sera pas poursuivie sur les 50 autres. Après chaque test, les poissons sans dommages seront libérés dans le cours d'eau, les individus souffrants euthanasiés.

14137 Les muscles sont des tissus essentiels au sein de l'organisme. Ils représentent plus de 40 % de la masse corporelle et permettent le maintien de la posture et le déplacement. La régénération tissulaire est un processus essentiel pour retrouver toutes les fonctions d'un organe suite un traumatisme. Le muscle des vertébrés adultes possède une capacité remarquable de régénération dépendant des cellules souches musculaires appelées cellules satellites. Bien que les cellules satellites possèdent un grand potentiel en médecine régénérative, les mécanismes régulant leur prolifération et leur différenciation sont encore mal caractérisés.

Les androgènes comme la testostérone sont des hormones régulant le développement et la maintenance des caractères sexuels mâles chez les mammifères. Les androgènes exercent leurs actions via leur récepteur, le récepteur des androgènes qui va contrôler l'expression de gènes cibles. Des études cliniques montrent qu'un traitement à la testostérone augmente la masse et la force musculaire. Afin de comprendre le rôle des androgènes via leur récepteur dans les cellules satellites au cours de la régénération musculaire, nous souhaitons réaliser une blessure dans un muscle de souris adultes en présence ou absence d'androgènes et de leur récepteur. Une fois la lésion effectuée, nous regarderons l'évolution de la régénération du muscle au cours du temps (de 1 à 28 jours après lésion). Le fait de savoir si les androgènes sont capables d'accélérer la régénération musculaire ouvrira ainsi de nouvelles perspectives pour le traitement de patients.

REMPACEMENT : Dans cette étude, l'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour mimer le plus fidèlement possible la dégénération et/ou la régénération fibrillaire, et observer les effets sur l'organisme entier, notamment du fait de la présence du système immunitaire qu'il est impossible de récapituler *in vitro*. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur la souris, animal pour lequel le processus de régénération musculaire est semblable à celui de l'homme et pour lequel nous disposons de tous les outils moléculaires nécessaires pour mener à bien cette étude.

REDUCTION : De nombreuses études menées au laboratoire sur la régénération musculaire ont mené à une bonne connaissance du modèle et de la méthodologie appropriée, permettant ainsi la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées sur un nombre limité de cohortes, et la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. La patte controlatérale sera systématiquement utilisée afin de réduire de moitié le nombre d'animaux requis. La nécessité de travailler sur la souris est également motivée par le fait que les modèles cellulaires actuellement disponibles n'expriment pas le récepteur des androgènes. En parallèle de cette étude, nous souhaitons donc développer un nouveau modèle de culture cellulaire de cellules satellites qui nous permettra à terme de fortement diminuer l'utilisation de souris au laboratoire.

RAFFINEMENT : Certaines expériences ayant des conséquences sur le bien-être de l'animal, les souris seront anesthésiées et traitées contre la douleur par des composés analgésiques. Elles seront placées sur un support chauffant afin d'éviter toute déperdition de chaleur causée par l'anesthésie. Les souris seront suivies dans les heures suivant leur réveil. Le risque d'infection sera pris en considération au niveau de la zone d'administration du composé induisant un dommage

musculaire. Étant donné que le projet cible les muscles squelettiques, la démarche de la souris sera examinée afin de s'assurer qu'elle ne présente pas de difficultés à se déplacer.

Ce projet nécessitera des analyses à différents niveaux. Nous étudierons l'histologie des muscles mais aussi les niveaux d'expression de gènes cibles de la cardiotoxine et des androgènes. L'ensemble de ces études et la mise en place du modèle cellulaire requerra ainsi 5170 animaux sur quatre ans.

14138 Le choc septique (défaillance multi-viscérale survenant au cours d'une infection grave associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS) est un problème de santé publique majeur dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population et dont la mortalité est comprise entre 30 et 70%. Malheureusement il n'existe pas de traitement adapté au choc septique ou au SIRS, conduisant à la mort de plus de 45 000 personnes par an en France. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons développé une approche visant à stimuler la O-GlcNAcylation dans le choc septique. La O-GlcNAcylation est une modification protéique responsable de la survie cellulaire qui joue un rôle majeur dans la réponse au stress. Les approches développées sont associées à une réduction importante des marqueurs de stress, à une amélioration de la fonction cardiovasculaire et une forte réduction de la mortalité dans le modèle de choc septique. La limitation actuelle repose sur les molécules pharmacologiques disponibles qui sont peu stables et qui présentent des effets indésirables importants. Nous proposons dans ce projet de tester de nouvelles molécules développées répondant à cette problématique. Le modèle animal de choc septique le plus adapté est ici le modèle par injection de lipopolysaccharide (LPS) chez le rat. Cela permet de générer un choc avec la symptomatologie du choc septique (SIRS, défaillance métabolique multiviscérale) de manière simple, très reproductible et dans une cinétique bien connue et maîtrisée dans notre laboratoire. La simplicité de la mise en place et la reproductibilité de ce modèle permettent un criblage des molécules efficaces avant d'aborder un modèle plus complexe. Les expérimentations sont conçues afin de respecter la règle des 3R : réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum tout en ayant des données statistiques assez puissantes (dans la mesure du possible les tests seront faits en aveugle, afin d'augmenter la puissance de l'étude) qui ne nécessiteront pas l'utilisation de nouveaux animaux et l'utilisation des animaux ne sera faite uniquement car le modèle n'est pas remplaçable. Les différentes procédures expérimentales de la première étape (mise au point) seront réalisées sur des effectifs réduits afin de déterminer les temps optimaux d'administration du traitement. Dans un second temps, lorsque les conditions d'utilisation optimales auront été déterminées, les procédures seront réalisées sur un plus grand nombre d'animaux avec seulement les conditions sélectionnées dans la première étape. Afin de raffiner le modèle, des mesures sont mises en place afin de maximiser le confort des animaux par exemple avec la mise en place de scores et de points limites comprenant des critères morphologiques (aspect, comportements) et physiologiques (température, fréquence respiratoire), l'administration d'antidouleur en début de procédure est prévue et la réinjection d'une dose supplémentaire peut être considérée en cas de signe de douleur. Enfin plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux et d'animaux nécessaires. Au total, le projet devrait intégrer 386 animaux au maximum, répartis entre les différents groupes nécessaires à l'étude : la mise au point du modèle animal et des différents temps de traitement : maximum de 15 rats, évaluation de nos traitements *in vivo* et l'établissement d'une bio-collection : maximum de 260 rats. Enfin 111 animaux seront, au maximum, utilisés pour l'étude de survie répartis entre les contrôles, les rats en choc septique et les rats traités aux temps et doses que nous aurons déterminés comme étant les plus pertinents dans notre étude. L'ensemble des détails sur le nombre d'animaux est récapitulé dans un tableau fourni en annexe. Le nombre d'animaux pour l'étude des traitements est calculé de la façon suivante : un nombre d'animaux statistiquement viable est sélectionné ($n=15$). A cela s'ajoute la mortalité de 30% soit $15 \times 30\% = 4,5$ soit 5 animaux $15+5=20$ animaux. Pour le traitement numéro, 5 cinétiques de traitement et 5 doses d'administration seront évaluées, soit 10 conditions pour la condition « LPS+R+TRAITEMENT » soit $20 \times 10 = 200$ animaux. Pour l'étude de survie, 111 animaux seront, au maximum, nécessaires. Dans un premier temps, un petit nombre de rats ($n=3$) du groupe CTRL et LPS seront étudiés, en fonction de la durée de survie des rats du groupe LPS, nous déterminerons la durée d'observation des rats

du groupe LPS+R et LPS+R+TRAITEMENT selon la formule : durée d'observation rats LPS+R et LPS+R+TRAITEMENT = durée de survie rats LPS multipliée par 2 + 10% (10% est une marge de temps supplémentaire attribuée de manière arbitraire). Un suivi de la survie sera réalisé en fonction du temps déterminé précédemment, dans nos différents groupes (CTRL, LPS, LPS+R et LPS+R+TRAITEMENT), chaque groupe comportera quinze animaux, excepté pour le groupe LPS+R+TRAITEMENT où 60 animaux seront utilisés (2*15 pour deux doses d'administration du traitement et 2*15 pour deux temps d'administration du traitement qui auront été déterminés comme étant les plus pertinents au cours de notre étude). Dans le cas de l'étude de survie, 15 animaux seront utilisés pour chaque groupe et non 20 comme lors de l'étude des traitements. Ceci est justifié de part l'absence de manipulation pouvant causer la mort de l'animal (chirurgie, canulation) ceci permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le projet.

14139 L'insuffisance cardiaque est un problème de santé publique majeur dont la prévalence varie de 1% à 2% dans les pays développés et qui augmente avec l'âge.

Environ 5% de cette population souffre d'insuffisance cardiaque au stade terminal et dans ce cas, la transplantation cardiaque est le seul traitement envisageable. Cette solution a des limites : la pénurie d'organes, diverses comorbidités (rejet aigu du greffon, conséquences d'un traitement immunosuppresseur au long cours). Ainsi seulement 4 500 patients par an peuvent être transplantés sur les plus de 100 000 atteints d'insuffisance cardiaque en phase terminale.

En réponse à ce besoin des systèmes d'assistance circulatoire mécanique ont été mis sur le marché, notamment des dispositifs d'assistance ventriculaire gauche (LVAD), en tant que thérapie alternative. Malheureusement, ces LVAD ne sont pas destinés aux patients atteints d'insuffisance cardiaque bi-ventriculaire, et de plus ils provoquent de graves complications (thrombose, infection, hémorragie...) qui augmentent la mortalité postopératoire et limitent l'accès à la greffe.

Actuellement, il n'y a qu'une seule assistance circulatoire bi-ventriculaire commercialisée, et celle-ci ne peut être utilisée qu'en attente de transplantation, avec des taux de survie de 60% et 40% après, respectivement, 5 et 10 ans post-greffe. Ces résultats doivent être nuancés, d'une part, parce que le dispositif génère des complications sévères de type thrombo-hémorragique et infectieux, d'autre part parce que l'encombrement et le bruit engendrés par ce dispositif contribuent à altérer la qualité de vie des patients.

La procédure chirurgicale d'implantation de ce dispositif a besoin d'être optimisée de manière à réduire le temps opératoire, le temps de circulation extracorporelle en particulier, ce qui conduira à faciliter la récupération des patients et ainsi réduire leur hospitalisation. C'est dans cette optique que nous développons notre dispositif de cœur artificiel total.

Les premiers résultats cliniques portant sur 15 patients montrent la nécessité de revoir les interfaces anatomiques de la version actuelle, notamment les raccords à l'artère pulmonaire et aux oreillettes natives laissées en place. Ainsi, nous cherchons à :

1) améliorer les performances hémodynamiques, à assurer une perfusion efficace des organes et à maximiser l'hémocompatibilité. Ces améliorations vont permettre de fiabiliser la procédure chirurgicale, de réduire le risque de complications associées, et de favoriser les procédures d'explantation en prévision d'une transplantation voire d'un remplacement.

2) Evaluer, dans un second temps, une réduction du volume implanté et la connectique du cordon percutané, pour réduire les contraintes anatomiques et ainsi donner accès au traitement à un plus grand nombre de malades.

Les caractéristiques uniques de notre dispositif, à savoir un actionnement électrohydraulique associé à des interfaces mécaniques et des matériaux d'origine biologique, nous permettent d'envisager une amélioration majeure dans le paysage du traitement de l'insuffisance cardiaque. Seule l'expérimentation *in vivo*, mimant au plus proche les réponses physiologiques et hémodynamiques, permet :

- la mise en œuvre de la procédure d'implantation chirurgicale en position orthotopique et sous circulation extracorporelle (CEC)

- la procédure de purge/sevrage et la vérification de l'absence de saignement après hémostase,
- la restauration des constantes hémodynamiques (pression artérielle et veineuse, pressions auriculaires...)
- la faisabilité et la fiabilité de la procédure d'explantation.

Le veau est le modèle animal le plus adapté à notre dispositif car il présente à la fois des dimensions intra-thoraciques et des capacités débitométriques compatibles de notre dispositif. L'ensemble des complications cliniques induites par l'implantation de ce dispositif (hémorragies, accidents thromboemboliques), ainsi que les interactions hémodynamiques, chimiques et hormonales (induites notamment par des CEC longues) ne peuvent être simulées ou appréhendées via des simulateurs. Les rapports anatomiques et conditions hémodynamiques spécifiques de la période péri-opératoire doivent être reproduits au plus près des conditions humaines afin de réduire les risques et ainsi permettre de valider le design d'un dispositif implantable.

Il a été prévu que les implantations in-vivo se déroulent à raison d'une implantation par mois sur 5 ans, soit un total de 50 animaux. Ce nombre est un plafond évalué a priori, en tenant compte des avancées prévisionnelles de nos projets R&D. Cette démarche permet de limiter la durée de l'implantation et ainsi d'éviter le recours à des essais animaux chroniques. C'est ainsi que le nombre d'implantations pourra être revu à la baisse en fonction des besoins réels de l'expérimentation. Nous nous attachons à réduire au maximum la souffrance des veaux, un vétérinaire anesthésiste étant présent à chaque implantation afin d'assurer un monitoring précis des signes de souffrance des animaux.

Chaque intervention est réalisée sous anesthésie générale et analgésie durant toute la procédure jusqu'à l'euthanasie. Un niveau de douleur trop élevé entraîne systématiquement l'euthanasie anticipée de l'animal.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'assurer une meilleure connaissance des spécificités liées à la procédure chirurgicale d'implantation et d'explantation de notre dispositif et ainsi, d'accroître les chances de survie et la récupération des patients.

14140 Cette demande concerne la toxicité de nouveaux modèles de peaux artificielles, fonctionnalisées avec différents types de substances, pour utilisation dans le cadre de greffes cutanées reconstructrices. L'objectif de ce projet est de déterminer la potentielle toxicité locale et systémique des greffons par des analyses biochimiques, immunohistochimiques et histopathologiques.

Le projet est envisagé sur une durée de 3 ans avec une prévision d'une étude par an, soit un maximum de 3 études. Un maximum de 125 animaux sera utilisé pour 3 ans.

Ce projet comprend 2 procédures expérimentales.

La procédure n°1 correspond à une étude préliminaire pour valider le protocole de greffe. Elle consistera en la greffe d'échantillons de peau humaine sur le dos de souris athymiques (nude) et en leur suivi au plan clinique pendant au moins 8 jours. Cinq animaux seront utilisés pour cela.

La procédure n°2 correspond à la réalisation des études principales. Elle consistera en la greffe d'échantillons de peaux artificielles sur le dos de souris de même souche, du suivi des animaux au plan clinique jusque 3 mois après la greffe, et d'analyses *ex vivo* pour évaluer leur toxicité. Dans cette procédure, un maximum de 40 animaux sera utilisé par étude, soit 120 animaux pour 3 ans. Le schéma expérimental prévoit 4 animaux par modalité, sachant 5 groupes au maximum (4 types de peaux artificielles et un témoin négatif), et 2 temps de sacrifice (1 et 3 mois après la greffe).

Le nombre de peaux artificielles qui sera testé pour chaque étude définira le nombre de groupes considérés par essai.

Dans les deux procédures, les animaux seront observés au plan clinique au moins une fois par jour et pesés au moins une fois par semaine.

Après mise à mort, un examen macroscopique et des analyses biochimiques, immunohistochimiques et histopathologiques seront réalisés sur des échantillons de sang et de peau collectés post mortem.

Le tatouage des animaux à l'oreille pour l'identification et la greffe de peau seront pratiqués sous anesthésie par inhalation d'isoflurane.

Un traitement antalgique pré- et post-opératoire sera administré.

Une démarche d'évaluation et de prise en charge de la douleur selon la nature et le degré de souffrance observé a été spécifiquement définie pour ce projet.

Tous les animaux seront sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital.

Au plan de la réduction, plusieurs paramètres biologiques seront évalués sur un même animal, permettant ainsi de minimiser le nombre d'animaux utilisés.

Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement seront adaptées aux souris immunodéprimées et enrichies pour favoriser leur bien-être. Elles seront hébergées dans des cages individuellement ventilées, et recevront de la nourriture irradiée et de l'eau de boisson autoclavée. Tout le matériel d'hébergement sera également autoclavé préalablement à son utilisation. Un fond sonore sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront disposés dans leurs cages d'hébergement pour aider à la thermorégulation et favoriser leur développement cognitif. Les animaux seront hébergés à plusieurs par cage durant la période d'acclimatation, individuellement après la greffe pour éviter qu'ils ne s'arrachent mutuellement leurs pansements, puis à nouveau à plusieurs par cage lorsque la plaie sera cicatrisée et jusqu'à la fin de l'étude. Après l'opération, un gel nutritif sera disposé dans les cages pour permettre aux animaux de récupérer plus rapidement. Un suivi sanitaire adapté à la vulnérabilité des souris nude sera également réalisé.

Pour ce qui est du remplacement, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives à l'expérimentation animale qui permettent seules de répondre au questionnement concernant la toxicité systémique de modèles de greffons de peaux artificielles fonctionnalisées. Pour compléter les résultats des études *in vitro* de toxicité des modèles de peaux qui seront testés, le recours à des expérimentations *in vivo* est donc indispensable. Concernant le choix des animaux, le projet utilisera des souris nude, lignée prédisposée à la greffe, à l'âge jeunes adultes, car plus robustes.

14141 La sérotonine est un neurotransmetteur impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la thermorégulation, le cycle veille-sommeil ou la douleur. Ses altérations sont évoquées dans de nombreuses pathologies telles que la dépression, l'anxiété ou la mort subite du nourrisson. Elle peut se fixer sur différents récepteurs, dont le sous-type 6 récemment identifié, d'abord chez le rat puis dans le cerveau humain. Ce sous-type du récepteur est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la mémoire, l'apprentissage ou la régulation de la prise alimentaire et du poids.

Récemment, de nouvelles découvertes dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, maladie incurable menant à des démences et un déclin cognitif irréversible, ont montré une réduction significative de la densité de ces récepteurs dans certaines zones cérébrales des patients.

Ainsi, ce récepteur pourrait constituer une nouvelle cible appropriée pour le traitement de ces démences dégénératives.

Cependant, les premières études cliniques menées ne sont, pour le moment, guère concluantes, avec des résultats mitigés voir négatifs.

L'apport de la Tomographie par Emission de Positons, une méthode d'imagerie non invasive, serait donc primordial pour comprendre l'implication de ces récepteurs dans la maladie d'Alzheimer mais aussi suivre, à long terme, l'effet de futurs traitements chez des patients.

Pour cela, nous devons donc disposer d'un radiotracer permettant de marquer et cartographier ces récepteurs.

Un tel radiotracer a récemment été développé et des études préliminaires ont montré sa fiabilité pour la visualisation des récepteurs chez des primates non humains.

Cependant, avant d'envisager une future utilisation chez l'Homme, il convient de mieux caractériser ce traceur, notamment en connaissant son comportement et son devenir dans les tissus, cela au travers d'une technique nommée fonction d'entrée.

Cette méthode permet, grâce à des dosages sanguins issus de prélèvements artériels, d'obtenir des paramètres pharmacologiques essentiels, comme la densité des récepteurs ou l'affinité du radiotraceur pour les récepteurs.

Cette étude pilote de recherche fondamentale, prévue sur 2 ans, a donc pour objectif de caractériser la fixation de ce nouveau radiotraceur pour les récepteurs sérotoninergiques de sous-type 6 en réalisant une fonction d'entrée chez le porc.

Le choix du modèle porc s'explique par le fait que des études antérieures ont montré que le radiotraceur ne passe pas la barrière hémato-encéphalique dans le modèle rongeur.

Ainsi, notre projet comprendra une seule procédure de gravité légère, réalisée sur 10 porcs maximum. Les animaux passeront deux examens d'imagerie au cours de la même semaine (premier examen de gravité légère, deuxième examen sans réveil). Les prélèvements sanguins pour la réalisation de la fonction d'entrée seront réalisés lors du 2ème passage TEP et l'animal sera mis à mort à l'issue de cet examen.

Règle des 3R

Remplacement : Un modèle animal est nécessaire car nous souhaitons étudier le devenir du traceur dans les tissus. Nous avons donc besoin des organes entiers dans leur environnement ainsi que d'une circulation sanguine efficace pour assurer la biodistribution du traceur dans l'organisme.

Réduction : Le nombre prévu d'animaux est maximum. En effet, les données seront analysées au fur et à mesure et dès que les paramètres attendus seront obtenus, le protocole s'arrêtera.

Raffinement : Le choix du porc comme modèle repose sur le fait qu'il s'agit d'une espèce anatomiquement et physiologiquement proche de l'Homme. Des actions seront mises en place pour veiller au bien-être de l'animal (période d'acclimatation, passage régulier de l'animalier, milieu matériellement enrichi) et lors des examens TEP, l'animal sera sous anesthésie générale profonde, permettant à l'animal de ne ressentir aucune douleur.

14142 L'implantation cochléaire consiste à mettre en place une électrode directement dans la cochlée (organe sensoriel de l'audition) afin de stimuler la cochlée directement de façon électrique. Cette implantation cochléaire a considérablement amélioré la prise en charge des patients porteurs d'une surdité neurosensorielle sévère à profonde. En effet, elle permet de redonner de l'audition à des patients sourds pour lesquels l'appareillage auditif conventionnel n'est plus suffisant. Mais cette implantation peut être traumatique, responsable d'une perte de cellules de la cochlée et d'une fibrose post-traumatique. Ces modifications tissulaires post-traumatisme implantatoire sont à l'origine d'une perte de l'audition résiduelle du patient d'une part, et, d'autre part, d'une dégradation des performances de l'implant. Ces modifications post-traumatiques peuvent être réduites ou limitées par l'utilisation de principes actifs otoprotecteurs (protecteurs sur l'audition) : corticoïdes (Dexaméthasone) pour leur rôle anti-inflammatoire (diminution de l'inflammation induite par l'implantation) et anti-apoptotique (diminution de la mort cellulaire programmée induite par l'implantation) et N-Acétyl-Cystéine pour son rôle anti-oxydant (diminution de l'oxydation tissulaire induite par l'implantation).

L'objectif de notre étude est donc d'étudier, *in vivo*, l'utilisation d'implants cochléaires avec porte-électrodes chargés en Dexaméthasone et en N-Acétyl-Cystéine.

Le modèle animal utilisé est la gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) puisqu'il s'agit du rongeur ayant le spectre auditif le plus proche de l'humain, qu'il fait peu d'infections de l'oreille, qu'il possède une bulle auditive large permettant une implantation cochléaire par voie rétro-auriculaire.

Soixante gerbilles de Mongolie seront utilisées, après au moins 7 jours d'acclimatation avant toute procédure expérimentale, et hébergées par deux, selon les recommandations en vigueur avec un enrichissement par du foin en complément de la litière classique, ainsi qu'un tunnel. L'audition de chaque animal aura été vérifiée par Potentiels Evoqués Auditif (PEA) permettant de tester

directement l'activité des voies auditives. Les animaux seront répartis en 3 groupes de 20 : groupe « Nu » (implantation par implant cochléaire nu, non chargé en principe actif), groupe « Dexa » (implantation par implant cochléaire chargé en Dexaméthasone) et groupe « DexaNAC » (implantation par implant cochléaire chargé en Dexaméthasone et N-Acétyl-Cystéine). Puis les gerbilles seront testées par PEA et électrophysiologie sur implant (test des résistances électriques et de l'activité du nerf auditif) une à 1 semaine et à 1 mois. A l'issue de ce mois, la moitié des gerbilles de chaque groupe sera mis à mort (dislocation cervicale) et les cochlées et implants analysés (sous-groupe « court-terme »). La deuxième moitié sera testée par PEA et électrophysiologie sur implant une fois par mois pendant 5 mois. Puis cette deuxième moitié sera mise à mort à 6 mois de son implantation (dislocation cervicale) et les cochlées et implants analysés analysées (sous-groupe « long-terme »).

Les cochlées récupérées seront transparisées (rendues transparentes) et analysées en immunofluorescences par microscopie confocale à balayage laser ou microscopie à feuille de lumière : compte des cellules ciliées et neurofilament, fibrose post-traumatique.

Les implants explantés seront secondairement analysés par Microscopie Electronique à Balayage (évolution de leur structure au cours du temps, 1 mois et 6 mois) et Spectroscopie Raman (étude de la composition moléculaire, pharmacocinétique de libération du principe actif *in vivo*).

L'ensemble des gestes invasifs (PEA et chirurgie d'implantation cochléaire) ou nécessitant l'immobilité de l'animal (électrophysiologie sur implant) ainsi que la mise à mort seront réalisés sous anesthésie générale gazeuse (Isoflurane). En cas de signes de douleur un traitement analgésique sera mise en place précocément par injection intrapéritonéale de Buprénorphine.

On espère mettre en évidence une meilleure préservation cellulaire avec moins de fibrose cochléaire responsables de meilleurs résultats fonctionnels auditifs et électrophysiologiques dans le groupe « DexaNAC » que dans le groupe « Dexa » qui sera lui même meilleur que le groupe « nu » et que ces résultats se maintiendront dans le temps (pas de différence entre sous-groupes « court-terme » et « long-terme »), voire se renforceront avec le temps.

La règle des 3R de Russel et Burch sera respectée. La Réduction du nombre d'animaux sera permise par la bonne connaissance de ce model animal par notre équipe, permettant de s'affranchir d'animaux "tests" puisque l'ensemble des techniques envisagées sont maîtrisées par notre équipe. Par ailleurs, la pharmacocinétiques (étude de la libération dans le temps) des principes actifs aura pu être réalisée *in vitro*, en incubateurs, permettant une réduction du nombre d'animaux nécessaires. Ainsi, seule la pharmacodynamie (efficacité) des principes actifs nécessitera l'usage d'un modèle animal. Le Raffinement sera réalisé par l'ensemble de l'enrichissement prévu (foin, tunnels), les traitements analgésiques en cas de douleur et par le respect des points limites et l'euthanasie des animaux en cas de souffrance. Enfin, le Remplacement du modèle animal aura été réalisé pour la pharmacocinétique : l'étude de la libération des principes actifs (Dexaméthasone et N-Acétyl-Cystéine) à partir des implants aura été réalisée au préalable, *in vitro*. En revanche, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal dans l'étude de l'audition et de la cochlée, d'où la nécessité de travailler sur l'animal.

14143 Staphylococcus aureus est un agent infectieux à la fois commensal et pathogène. Il est d'un point de vue pathogène le 1er agent d'infections communautaires graves (endocardites infectieuses, infections de la peau et des tissus mous) et d'infections associées aux soins (infections du site opératoire, infections en hémodialyse...). Il colonise par ailleurs de façon asymptomatique 20 à 30% de la population au niveau de la muqueuse nasale principalement mais peut coloniser les autres sites muqueux comme la muqueuse digestive.

Les porteurs de S. aureus ont un sur-risque important d'infection à S. aureus notamment lors d'une chirurgie. Ces infections sont dites endogènes car liées à la souche de portage. Des mesures de prévention de ces infections sont donc proposées aujourd'hui telles que la décolonisation des patients porteurs avant un geste chirurgical orthopédique ou cardiaque. Cependant beaucoup de choses restent à connaître concernant la colonisation muqueuse à S. aureus, les interactions microbiennes au niveau muqueuse, le passage de la colonisation à l'infection à S. aureus. De la

même façon les stratégies de prévention du risque infectieux existantes sont imparfaites comme des travaux de recherche clinique l'on montré et de nouvelles stratégies doivent être proposées.

Nos travaux d'épidémiologie cliniques nous ont permis de progresser quant au risque infectieux lié à ce portage. Nos travaux *in vitro* sur un modèle de muqueuse nasale en monocouche cellulaire ou d'épithélium nasal reconstruit en 3D (Epithelix®) nous ont permis de mieux appréhender le rôle de l'inflammation (co-infection virale, TNF) concernant l'internalisation de *S. aureus*.

Toutefois afin de progresser davantage sur la physiopathologie, les interactions microbiennes et pouvoir tester des stratégies thérapeutiques préventives, un modèle *in vivo* de souris est indispensable. Ce d'autant que ce modèle permet également les challenges d'infections ce qui nous permettra de mieux comprendre le passage de la colonisation à l'infection.

Le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 1215 animaux sur une période de 5 ans.

De l'analyse *in vitro* sera effectué au cours du projet, avec notamment la quantification de *S. aureus*. Mais ces analyses *in vitro*, bien qu'indispensables, ne sont pas suffisantes pour analyser la colonisation muqueuse à *S. aureus*, au niveau nasal et au niveau digestif, pour étudier l'impact positif ou négatif de certains facteurs (co-infections virales /bactériennes, agents antimicrobiens, facteurs inflammatoires) et étudier le passage de la colonisation à l'infection.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2) ; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger).

Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

14144 Le rein est l'organe préposé à l'homéostasie des liquides et de certains métabolites présents dans le sang. La maladie rénale est un problème de santé majeur dans les sociétés occidentales et les estimations récentes suggèrent qu'une personne sur dix souffrira d'une pathologie rénale à un moment dans sa vie. L'unité fonctionnelle responsable de la fonction de filtration du rein est le glomérule : cette activité est assurée par des cellules extrêmement spécialisées, appelées podocytes. Des défauts de maturation des podocytes contribuent de façon significative à la perte rapide de fonctionnalité rénale, cause principale d'insuffisance rénale terminale. Des défauts de l'homéostasie des podocytes mûres sont associés à une forte probabilité de développer une insuffisance rénale terminale. De ce fait l'étude et l'identification des processus qui maintiennent la fonctionnalité de ces podocytes, sont importantes. Les podocytes sont des cellules très spécialisées qui, chez un individu sain, ne se divisent pas. Ces dernières sont alors dans un état de quiescence. Par contre une reprise soudaine des processus prolifératifs est observée chez les podocytes adultes soumis à un stress prolongé dans le cas de maladies chroniques (hyperglycémie diabétique, hypertension). Cette soudaine et incontrôlée réactivation de la prolifération des podocytes est un critère de progression de la pathologie, cela conduit à des symptômes de pathologies rénales dégénératives. Malgré l'importance du processus de la mise en place et du maintien de la fonctionnalité des podocytes, les données disponibles sur les mécanismes moléculaires sous-jacents sont rares et ne permettent pas de comprendre ces événements.

La protéine d'intérêt ici étudiée est un facteur de transcription, crucial pour le développement des podocytes et il est également associé au contrôle de la prolifération/différentiation d'autres organes. Les résultats générés lors de l'étude des mécanismes génétiques à la base de l'identité des podocytes suggèrent que la protéine pourrait être impliquée dans le contrôle de la mise en place et du maintien de la quiescence podocytaire.

Dans cette étude nous allons analyser en détails le rôle du facteur de transcription dans le maintien de la fonctionnalité rénale adulte. Pour ce projet nous utiliserons un modèle murin d'inactivation pour cette protéine. Cette lignée de souris a été déjà générée et utilisée pour analyser les effets de sa délétion dans d'autres organes (système reproductif, système hématopoïétique et système respiratoire), et il ne sera donc pas nécessaire de la générer par nous-même à travers de complexes procédures de transgénèse (Réduction). De plus nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés, puisque les biopsies seront analysées avec des méthodes biomoléculaires pour évaluer les variations de l'expression de gènes (séquençage des ARN codantes) ainsi que la prolifération cellulaire en l'absence de la protéine (Réduction). Dans une perspective de réduire le nombre de souris, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux qui sera malgré tout suffisant pour nous permettre d'obtenir des résultats qui seront statistiquement significatifs. Comme la protéine étudiée semble importante pour la fonction de filtration des podocytes des reins, et afin d'éviter toute souffrance associée à son absence et éviter tout effet secondaire dû à la dégradation du rein, nous allons effectuer toutes nos analyses avant l'apparition de symptômes (Raffinement). Les résultats attendus pour cette étude identifieront les voies de signalisation impliquées dans le control de processus prolifératifs et, éventuellement, permettront d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques conduisant à l'inhibition de la prolifération des podocytes observée lors de pathologies rénales humaines. Nous testerons *in vitro* (lignées cellulaire immortalisées et organoïdes rénaux) la capacité de ces molécules cibles à moduler les voies des signalisations identifiées lors de ce projet. Ces modèles alternatifs, bien que présentant des limites pour étudier les processus physiologiques d'homéostasie des podocytes, s'avèrent adaptés pour remplacer le modèle animal dans des expériences de criblage à large échelle de produits pharmaceutiques (Remplacement).

Pour le bon déroulement du projet nous nécessitons 135 souris adultes.

14145 La neurogénèse est définie comme la génération de nouveaux neurones. Pendant longtemps, ce processus a été considéré comme terminé après la naissance ou après l'adolescence. Plusieurs études ont par la suite montré qu'il existait une neurogénèse adulte grâce à l'existence de niches neurogéniques dans certaines zones spécifiques du cerveau en particulier le bulbe olfactif, le gyrus denté ou la zone subventriculaire. L'existence d'une niche neurogénique hypothalamique a été montrée il y a peu et a été peu explorée jusqu'à présent. Des cellules souches prolifèrent, migrent et subissent un processus de maturation pour se transformer en nouveaux neurones.

L'existence de la neurogénèse hypothalamique à l'âge adulte a été démontrée chez plusieurs espèces animales par des méthodes ex-vivo. Il existe également un grand nombre d'études in-vivo chez le rongeur. De par les différences génétiques et cellulaires (types de cellules, taux de croissance, projections) entre espèces, les caractéristiques, le développement et le contrôle de la neurogénèse à l'âge adulte chez le rongeur n'est pas représentatif et ne peut être extrapoler à l'être humain. Il est impératif de prouver l'existence de la neurogénèse chez l'être humain afin de démontrer son impact sur la santé humaine et les possibilités thérapeutiques attenantes, en particulier pour comprendre et résoudre les désordres liés des maladies neurodégénératives et psychiatriques. La neurogénèse adulte joue un rôle critique dans la plasticité neuronale, l'homéostasie du cerveau et le maintien des fonctions du système nerveux central. Par ailleurs, la neurogénèse adulte apparaît cruciale dans la préservation de la fonction cognitive et la réparation de cellules endommagées du cerveau lors du vieillissement et d'autres désordres cérébraux. D'autres facteurs tels que les diètes sucrées et lipidiques mais aussi les restrictions caloriques, l'exercice physique ou l'apprentissage modulent la neurogénèse. Dans le contexte présent, nous souhaitons examiner plus particulièrement, l'impact de la neurogénèse hypothalamique adulte sur les désordres alimentaires tels que l'anorexie et ou l'obésité.

Pour ce faire, les méthodes non-invasives de neuroimagerie telles que l'imagerie de résonance magnétique nucléaire (IRM) pourraient permettre une caractérisation in-vivo de la neurogénèse hypothalamique sur des brebis dont la morphologie du cerveau est plus proche de celle de l'homme. L'objectif du projet est d'identifier des marqueurs fonctionnels et métaboliques de la neurogénèse hypothalamique chez la brebis grâce à des techniques d'IRM mises en place à un champ

magnétique de 3 Tesla utilisé en routine clinique chez l'humain et pendant des stimulations environnementales telle que la photopériode et des stimulations physiologiques telles que des diètes supplémentées en aliments gras.

Afin de limiter de manière significative le sacrifice des brebis pour vérifier la présence de neurogénèse par des techniques immunohistochimiques, des agneaux adolescents sont utilisés afin de comparer la présence de neurogénèse postnatale à la neurogénèse adulte difficilement identifiable.

Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée qu'in-vivo. Les techniques d'IRM envisagées sont non-invasives et seront effectuées de manière longitudinale (chaque brebis étant son propre contrôle) permettant ainsi de réduire drastiquement le nombre d'animaux expérimentaux.

Réduire : Huit brebis et quatre agneaux constitueront le groupe d'animaux expérimentaux parce qu'il nous faut un nombre suffisant de brebis pour mesurer des signaux d'intensité faible à modérée comme les processus que nous allons étudier.

Raffiner : Les brebis seront intubées et anesthésiées sous isoflurane durant toute la durée des acquisitions. Leur température, rythmes cardiaques, respiration et pressions partielles de CO₂ et O₂ seront suivis en continu durant les acquisitions grâce à des moniteurs dédiés. Pour réduire le stress des brebis lors des périodes pré et post imagerie, elles seront maintenues dans un environnement social stable dans des conditions adaptées aux herbivores avec litière de paille et foin ad libitum.

14146 L'utilisation de l'enclos extérieur (dénommé parcours) par les poulets élevés en plein air est très variable et souvent faible. Les caractéristiques individuelles définissant la personnalité pourraient partiellement expliquer l'utilisation ou la non-utilisation de ce parcours.

Notre projet vise donc à caractériser davantage, au niveau comportemental, les différences existantes au sein d'un lot de poulets plein-air. En particulier, nous examinerons le lien entre utilisation du parcours, personnalité et comportements exprimés spontanément par les poulets (200 mâles). Il convient donc d'observer en condition d'élevage, dans le bâtiment et sur le parcours, les poulets dans leur groupe social, pour quantifier les comportements exprimés et l'utilisation du parcours. Afin de suivre les individus tout au long de leur vie et vérifier la stabilité des comportements, il est nécessaire que l'observateur puisse les identifier. Ainsi nous utiliserons des « ponchos » (voir procédure 1), une méthode d'identification non invasive mais pouvant occasionner des blessures ou un stress aux animaux, ou encore des modifications du comportement (démarche anormale, prostration).

Par ailleurs, nous souhaitons réaliser des tests individuels permettant de vérifier le lien entre l'utilisation du parcours et la personnalité (définie par l'existence de différences individuelles dans l'expression de comportements, stables au cours du temps et/ou dans différents contextes). Ces tests impliquent d'isoler les poulets de leurs congénères (voir procédure 2).

Remplacement : Le recours aux animaux vivants dans les études de comportement animal reste nécessaire, afin d'avoir une vision sur la complexité des réponses des individus face aux contraintes environnementales et sociales auxquelles ils sont soumis. Il est également important de se placer en condition d'élevage pour pouvoir suivre le comportement naturel d'exploration des animaux sur le parcours extérieur.

Réduction : Un lot de 200 poulets mâles sera requis pour simuler les conditions des élevages commerciaux. Afin de limiter le nombre de facteurs et conséquemment le nombre d'animaux nécessaires pour les tests statistiques, nos expériences seront réalisées uniquement sur des poulets mâles. La taille du groupe doit permettre d'approcher la densité réglementaire d'un élevage plein air et permettre l'identification des individus avec des comportements explorateurs extrêmes (les plus et les moins explorateurs). Le design expérimental et les statistiques utilisés (analyse en composantes principales, modèles linéaires, ANOVA) sont en accord avec la littérature existante pour l'étude de la personnalité animale et nous permettrons de tester un grand nombre d'individus tout en simulant ce qui pourrait se passer dans un élevage traditionnel.

Raffinement : Des stratégies de raffinement ont été mises en place pendant tout le processus expérimental. Les conditions d'élevage des animaux se rapprochent de celles d'un élevage avicole biologique classique conformément à la réglementation. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et de soins, avec un suivi quotidien afin d'assurer leur bien-être. Des points limites ont été déterminés et une surveillance au minimum quotidienne des animaux est assurée afin de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement.

14147 D'après l'OMS, le diabète de type II concernait plus de 422 millions d'individus dans le monde en 2014 et ce nombre continue d'augmenter. En 2015, 1,6 million de décès sont directement attribués au diabète de type II et 2,2 millions supplémentaires à l'hyperglycémie (taux de sucre trop important dans le sang).

Les personnes souffrant de diabète de type II font face à une diminution de leur qualité de vie et elles présentent des risques augmentés de survenue d'accidents cardiovasculaires. Des mesures hygiéno-diététiques comme une prise en charge nutritionnelle adaptée couplée à une activité physique sont des mesures efficaces de prévention de ces maladies. Le recours à des médicaments comme la metformine sont des mesures complémentaires à ces mesures hygiéno-diététiques lorsque la maladie a atteint un stade plus avancé. L'utilisation d'extraits végétaux en complément des mesures hygiéno-diététique est également une piste sérieuse pour la lutte contre l'obésité et le diabète de type II. Certains extraits végétaux issus de la pharmacopée européenne ont déjà montré des effets bénéfiques et protecteurs sur le microbiote intestinal et pourraient permettre d'améliorer la qualité de vie et de diminuer les facteurs de risques de développer un diabète de type II.

L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention et le développement du diabète de type II dans un modèle murin obèse et prédiabétique, et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces extraits végétaux en observant plus particulièrement la réponse à l'insuline.

Chez la souris, il est possible d'induire un état de prédiabète en nourrissant les animaux avec un régime riche en graisse et en sucres (mimant les mauvaises habitudes alimentaires impliquées en partie dans le développement du diabète de type II chez l'homme) durant plusieurs semaines.

L'évaluation de la réponse à l'insuline peut être faite par l'application d'une technique également utilisée chez l'Homme appelée Clamp euglycémique-hyperinsulinémique. Contrairement à l'Homme, cette technique chez les petits rongeurs nécessite cependant la réalisation d'un acte chirurgical préalable afin d'implanter le dispositif utilisé pour les mesures.

Ce projet de type nutritionnel nécessitera l'utilisation de 112 souris au maximum sur une durée de 5 ans. Ce nombre est choisi de manière à obtenir les réponses attendues en ayant recours à des effectifs les plus petits possible. Pour cela le projet se base sur la littérature scientifique existante, utilise des outils de calcul statistique (a priori et a posteriori) et privilégie les méthodes non terminales permettant les suivis longitudinaux des animaux. Les modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in silico*, bien que très utiles sur certains aspects et indispensables au principe de remplacement, ne permettent pas encore d'obtenir une approche globale aussi complexe que celle du diabète et de l'obésité chez un mammifère, pour approcher au plus près de la réalité retrouvée chez l'homme. Pour obtenir une première approche globale dans ce projet, l'utilisation de modèles murins de petite taille (souris) est cependant privilégiée aux plus grandes espèces plus susceptibles de ressentir de la douleur sur une plus longue période. Au cours de ce projet, les animaux seront placés dans un environnement adapté à leurs besoins physiologiques et observés quotidiennement sur la base de critères comportementaux (posture, appétit, interaction avec l'environnement...) et morphologiques (croissance, prise de poids, état général des dents, du poil...) pour prévenir au plus vite de la diminution de leur état de bien-être. Les différents tissus obtenus au cours de ce projet seront stockés pour permettre des analyses ultérieures et éviter de devoir recourir à un projet similaire dans le temps.

L'ensemble de ces dispositions favorisent le principe de réduction, raffinement et remplacement de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

14148 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes. Ces progrès n'ont pu être réalisés sans d'importants développements méthodologiques. Afin de poursuivre ces avancées techniques, notre projet consiste à optimiser ou développer de nouvelles séquences en IRM permettant d'obtenir *in vivo* des informations sur la fonction d'un organe, d'une partie d'un organe ou sur la totalité de l'organisme dans le temps et dans l'espace et de mettre en évidence des dysfonctionnements. Ces méthodes devront à terme pouvoir être utilisées en routine clinique chez l'homme.

Le projet présenté ici est basé sur l'étude de l'efficacité du traitement par injection de Plasma Riche en Plaquette (PRP) dans le disque pour traiter précocement la discopathie mécanique sur modèle murin. Chez l'homme, les discopathies entraînant des lombalgies sont très fréquentes, estimées entre 15 et 50% dans la population générale. Caractérisée par une atteinte en divers endroits du complexe disco-vertébral au niveau du squelette axial, la maladie se manifeste habituellement après 50 ans par un syndrome au niveau du rachis et du pelvis. Le retard diagnostique s'explique essentiellement par des plaintes cliniques aspécifiques évoluant par crise chez les patients.

La prise en charge est généralement symptomatique par repos, kinésithérapie voire infiltration rachidienne de dérivés cortisonés à but symptomatique.

Nous avons précédemment développé une séquence IRM permettant d'imager la plaque sous-chondrale des vertèbres (le plateau vertébral) de rats sains et pathologiques au niveau du complexe disco-vertébral.

Grâce à cette technologie, de nouvelles réponses peuvent être apportées, notamment sur le traitement. Est-ce que le PRP permettrait de traiter précocement la dégénérescence du complexe disco-vertébral ? Pour répondre à cette question, nous souhaitons étudier cette plaque sous-chondrale en cas d'inflammation. L'application *in vivo* est essentielle afin d'étudier cette plaque en condition physiologique (de poids et de mouvement) et l'imagerie du petit animal est indispensable pour mimer la pathologie humaine et ainsi tester un nouveau traitement.

Pour cela, 12 rats seront utilisés. En effet, chaque rat aura 3 étages inflammés mécaniquement au niveau de la queue. Un seul des 3 étages sera traité par PRP, l'autre servira de contrôle. Ceci permet de limiter au strict nécessaire le nombre d'animaux. Ces animaux seront imagés par IRM plusieurs fois pour évaluer l'évolution du signal inflammatoire au cours du temps après traitement. Le nombre d'animaux est faible du fait aussi de la non-invasivité de l'IRM tout en obtenant des statistiques. L'analgésie sera appliquée dès le début de l'expérimentation et sera poursuivie tout au long des 12 semaines d'observations IRM. Les 12 rats seront répartis dans 4 cages avec des tubes en carton, de la paille, du coton, un bois à ronger, de la nourriture et de l'eau à volonté. Des observations quotidiennes et des scorages d'évaluation de la douleur hebdomadaires seront pratiqués dès le début de l'expérimentation pour évaluer l'évolution de la maladie. De ce fait, des points limites ont pu être établis. La cellule bien-être du laboratoire sera impliquée quotidiennement dans l'évolution du protocole.

14149 Les sarcomes représentent environ 1% des cancers et sont issus de cellules transformées d'origines mésenchymateuses. Ce sont donc des tumeurs issues de différents lignages cellulaires tels que les cellules osseuses (ostéosarcomes), cartilagineuses (chondrosarcomes) ou de soutien des viscères (sarcomes des tissus mous). Leurs principales caractéristiques sont leur agressivité et leur facilité à envahir les tissus environnant, mais également à se disséminer loin de la tumeur primitive sous forme métastatique. Une des formes des sarcomes sont les sarcomes à génétique complexes démontrant un génome très remanié et hétérogène dont un des sous-type les plus fréquents sont les léiomyosarcomes. La compréhension de l'oncogenèse menant à ces génomes permettrait d'améliorer considérablement le soin des personnes atteintes puisque seul la chirurgie est, pour le moment, le traitement efficace. Dans le cadre de l'étude de ces tumeurs, nous avons démontré qu'une voie de signalisation comprenant la protéine SRF (serum response factor) est souvent altérée dans un groupe de léiomyosarcomes. Notre hypothèse est que l'altération de cet axe mènerait à un avantage prolifératif pour les cellules de léiomyosarcome. Le projet vise à évaluer

le ciblage thérapeutique de cette voie dans les léiomyosarcomes. Deux types d'inhibiteurs seront évalués l'un ciblant l'interaction entre la protéine SRF et une autre protéine de sa voie et un ciblant la protéine RhoA ayant un rôle en amont du SRF. Les études *in vitro* ont démontré un impact de ces inhibiteurs sur différentes lignées modèles de léiomyosarcomes.

Ce projet est envisagé car il n'existe pas de modèles alternatifs *in vitro* ou *in silico*. En effet, nous souhaiterions démontrer, dans des conditions les plus physiologiques possibles, que l'altération de l'axe SRF est une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des léiomyosarcomes.

Nos expériences ont pour finalité l'amélioration de la santé humaine et l'expérimentation *in vivo* est non substituable à aucune autre méthode car nous avons besoin d'un organisme complet pour étudier le traitement des tumeurs. Les techniques utilisées se limitent à l'injection des cellules tumorale et des traitements par injection ou par voie orale ainsi que de la mesure extérieure des tumeurs. L'utilisation de ces techniques peu invasives permet ainsi d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié permettant de réduire sensiblement le nombre d'animaux utilisés. Ainsi environ 408 souris Athymic NUDE (Rj: ATHYM-Foxn1nu/nu) seront utilisées pour l'ensemble de l'expérience. Durant toute la période d'expérimentation, afin de limiter la souffrance des animaux, l'état général des animaux sera observé quotidiennement au cours des expérimentations et en cas de souffrance importante ils seront mis à mort, si nécessaire. Le weekend le suivi des animaux sera assuré par les zootechniciens diplômés. Les points limites entraînant la mise à mort seront une perte de poids supérieure à 20%, une ulcération de la tumeur, un comportement moribond ou une automutilation. Un enrichissement de type carré de sopalin et/ou carton sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire une nidification. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3 R (remplacement, réduction et raffinement) et la directive européenne 2010/63/UE.

14150 Les défauts osseux consécutifs aux pseudarthroses (non consolidation de fracture), fractures complexes, reprises de prothèses et tumeurs concernent de nombreuses interventions orthopédiques. Ces défauts de grande taille peuvent requérir la mise en place d'une greffe osseuse provenant du patient ou d'un donneur, qui présentent des problèmes de disponibilité et/ou de qualité de l'os prélevé. L'ingénierie tissulaire osseuse, qui consiste à combiner un biomatériau et des cellules capables de produire de la matrice osseuse, est une alternative prometteuse. Un procédé innovant de fabrication directe par fusion laser permet maintenant de fabriquer des implants à base d'hydroxyapatite, composé minéral équivalent à celui de la matrice osseuse, ayant une architecture « à façon ». L'objectif de ce projet est d'utiliser ces implants de nouvelle génération pour optimiser la macroarchitecture de l'implant en vue d'améliorer la régénération osseuse par ingénierie tissulaire: différentes architectures de pores seront testées pour leur capacité à supporter le potentiel réparateur de cellules souches adultes. Pour chacune de ces architectures plusieurs densités d'ensemencement cellulaire seront testées.

Ce projet est une phase de pré-expérimentation pour une étude qui a été validée par le comité d'éthique. Pour ce projet, un modèle d'implantation sous-cutané chez le rat sera utilisé pour cribler plusieurs densités d'ensemencement cellulaire des implants de nouvelle génération à base d'hydroxyapatite ou d'hydroxyapatite carbonatée. Ce modèle permet, en effet, de suivre aisément la viabilité des cellules implantées par imagerie bioluminescente et de tester plusieurs concentrations/matériaux chez un même animal. Les résultats obtenus permettront de connaître la densité optimale à utiliser pour une étude prévue en site osseux. En outre, ce modèle permettra également d'évaluer le potentiel ostéogénique propre des implants (en absence de tout contact osseux).

Pour cette étude, nous allons évaluer l'impact de la macroarchitecture et du matériau sur la survie cellulaire et la formation osseuse. Pour cela les implants seront chargés en cellules souches mésenchymateuses de rat puis implantés en sous-cutané pendant 8 semaines. La viabilité cellulaire sera évaluée à J1 et 1, 2, 4 et 8 semaines. La formation osseuse sera évaluée à 8 semaines. 4 types de macroarchitecture (porosité gyroïde, ovale, carrée, fractale), 4 concentrations cellulaires, et 2 matériaux seront testés (32 groupes, pour chaque groupe le nombre d'implant sera de 8, à raison de 4 implants/rat) soit 64 rats.

Total des animaux : 64 rats

Il n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de reproduire la complexité de l'environnement *in vivo* impliqué dans la survie cellulaire et la formation osseuse. Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasives (bioluminescence) seront utilisées pour suivre la survie cellulaire sur le même animal ce qui permet de réduire significativement le nombre d'animaux. Les animaux seront hébergés dans des cages adaptées contenant des copeaux et des structures de jeux et seront à 2 ou 3 individus par cage pour permettre un enrichissement social. Les animaux ne seront mis à mort qu'au temps terminal de l'étude. La souffrance sera limitée par analgésie post-opératoire et contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude.

14151 L'administration de médicaments peut se faire de diverses manières (ingestion, inhalation, absorption ou injection). Chaque méthode présente ses avantages et inconvénients, et toutes les méthodes ne peuvent pas être utilisées pour tous les médicaments. Selon la voie d'administration, les médicaments passent dans la circulation et une fraction plus ou moins importante arrive directement au foie. Cet organe joue un rôle primordial dans l'efficacité des médicaments, en permettant leur activation. Il est également très important pour leur tolérance en inactivant les molécules pour prévenir ainsi les effets secondaires. On parle alors de premier passage hépatique. Différentes voies d'administration sont connues pour permettre aux médicaments d'atteindre rapidement le foie. La première d'entre elle est la voie intrapéritonéale, dont l'intérêt est de plus en plus mis en avant pour une délivrance plus ciblée de certains traitements anticancéreux. Elle a en premier lieu été utilisée pour obtenir un premier passage hépatique et ainsi une administration plus physiologique de l'insuline chez les patients diabétiques de type 1. Cependant, il est connu que la nature de la molécule joue un rôle clé dans le premier passage hépatique lors de l'administration intrapéritonéale. Ainsi, différents travaux ont montré que la taille, la nature chimique (solubilité dans l'eau ou dans des solutions huileuses) peuvent modifier la distribution de ce qui est administré. Cependant, aucun travail de ce type n'a été réalisé avec différentes insulines, pour laquelle un passage rapide vers le foie est primordial pour obtenir une administration physiologique et une meilleure efficacité chez le patient diabétique. Une autre voie, moins utilisée permet également un premier passage hépatique des médicaments : la voie submucosale, située entre la muqueuse gastrique ou intestinale et les couches musculaires externes. Elle permet un passage des médicaments vers le foie encore plus ciblé que l'intrapéritonéal sans impact connu de la taille ou de la nature de la molécule administrée.

Ce projet a donc pour but de comparer l'efficacité et le premier passage hépatique de différentes insulines administrées soit en intrapéritonéal soit en submucosal au niveau gastrique (notre contrôle positif). Les différentes insulines testées diffèrent par leur structure ou encore leur solubilité dans l'eau. Les résultats attendus détermineront les insulines qui permettent d'obtenir le premier passage hépatique le plus important, et de cibler les celles qui pourront être utilisées en clinique pour une administration intrapéritonéale.

L'étude se déroulera en deux phases. La première sera réalisée sur des rats non diabétiques qui recevront, via des cathéters en intrapéritonéal ou en submucosal au niveau gastrique, 5 insulines différentes à la même dose, afin de mesurer, via des prises de sang, la quantité d'insuline qui arrive directement au foie. Suite à cette première phase, les 3 insulines présentant le passage le plus important vers le foie seront ensuite testées sur des rats diabétiques, à la même dose que lors de la première phase. La glycémie de ces animaux sera alors suivie pendant plusieurs heures après injection.

Remplacement : La distribution et l'efficacité des différentes insulines en fonction de la voie d'administration mettant en jeu plusieurs tissus et organes, elle ne peut être modélisée *in vitro*. Ces deux paramètres sont évalués par des suivi de glycémie et des prises de sang qui ne sont pas réalisables *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum tout en permettant, grâce à des tests statistiques adaptés, de mettre en évidence des différences significatives au niveau des paramètres étudiés.

Raffinement : Il intervient au niveau de l'anesthésie, réalisée au gaz pour un meilleur contrôle, et de la prise en charge post-opératoire par l'administration d'un anti-inflammatoire et anti-douleur. Il intervient également un niveau de l'hébergements avec un enrichissement des cages à l'aide de cylindres en PVC rouge, qui servent de refuge aux animaux et permet ainsi de diminuer leur stress. Le raffinement est aussi présent dans le suivi des animaux, avec l'utilisation d'une grille d'évaluation adaptée aux procédures, qui permet de détecter rapidement la souffrance, la douleur chez les animaux et de mettre en place les traitements adaptés. En accord avec cette grille d'évaluation, des points limites prédictifs ont été déterminés afin de soustraire les animaux aux procédures expérimentales.

Cette étude nécessitera 264 animaux au total.

14152 La migraine est un désordre neurovasculaire caractérisé par des crises récurrentes de céphalée accompagnées de troubles neurologiques variables dont l'allodynie cutanée céphalique (sensation douloureuse au toucher léger). Ce symptôme est le plus fréquent chez les patients atteints de migraine. Il affecte 60 à 80% des patients souffrant de migraine chronique. De plus, l'apparition de l'allodynie est considérée comme un facteur de risque de chronicisation de la migraine. Parmi les nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, les inhibiteurs des enképhalines sont des candidats intéressants sachant que les études préliminaires de deux composés, IEnk1 et IEnk2, ont montré une activité anti-allodynique chez le rat. L'allodynie mécanique céphalique est mesurée dans un modèle de migraine, chez le rat, déclenchée par l'injection systémique intrapéritonéale d'un donneur de NO (monoxyde d'azote), l'isosorbide dinitrate (ISDN). En effet, l'IEnk1 par voie orale réduit l'allodynie dans le cas d'une seule injection de ISDN (migraine aiguë) et apparaît comme plus efficace que le traitement de référence (par triptan) de la migraine aiguë. Pour le IEnk2, par voie orale, les effets ne sont pas significatifs.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer : -1/ l'effet antalgique prophylactique de l'IEnk1 par voie orale (administration répétée 1/j/5j) sur le modèle de migraine chronique (injections répétées d'ISDN, 1/jour/5jours) en comparant avec le groupe témoin qui sera soumis à l'administration orale répétée de propranolol (traitement prophylactique de référence), -2/ l'effet prophylactique de l'IEnk2 versus propranolol mais par injection cutanée pour une possible meilleure disponibilité de l'agent (par rapport à la voie orale) ; et 3/ l'effet du blocage pharmacologique périphérique des 2 inhibiteurs (par blocage des récepteurs opioïdes périphériques) pour caractériser si leur effet passe par un mécanisme périphérique et/ou central. Enfin, dans une dernière analyse, nous souhaitons identifier par immunohistochimie les sites d'actions anatomiques (cellulaire) de l'IEnk1 dans le modèle de migraine aiguë (1 injection ISDN) ou chronique (injections ISDN répétées 1/j/5j) et ce par analyse d'un marqueur d'activation neuronale à différents relais nerveux de l'information douleur.

Le nombre de rats par groupe a été fixé au maximum à 16 en tenant compte du fait qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 15 à 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN (comme chez l'homme). Dans cette étude, 8 groupes de rats seront utilisés :

-1 groupe recevant en traitement préventif (prophylactique) de l'IEnk1 (n=16) par voie orale (1 fois par jour pendant 5 jours) comparé à 1 groupe témoin qui recevra du propranolol (10mg/kg) par la même voie et à la même fréquence (n=10). A partir des 16 rats recevant l'IEnk1 (et afin de réduire le nombre d'animaux utilisés), une moitié (8 rats) recevra lors d'une 6ème injection d'ISDN (6ème jour) une administration préventive d'un bloqueur des récepteurs opioïdes et sera comparée aux rats recevant une solution saline (n=8). Le même protocole sera adopté pour l'IEnk2 mais comparé à un groupe saline et avec administration par voie sous cutanée.

Les groupes seront soumis (10 minutes après l'administration orale ou sous cutanée des IEnk) à 5 injections répétées d'ISDN (1 /j /5 jours) et les effets sur la sensibilité mécanique (mesure du seuil de retrait de la face lors d'une stimulation mécanique très légère) seront mesurés après chaque injection d'ISDN toutes les 1/2 heures sur une période 4h.

- 4 groupes (n=6 chacun) concerneront l'analyse immunohistochimique d'un marqueur d'activation neuronale qui sera identifié et localisé dans le tissu nerveux à la suite d'une injection systémique

unique ou répétée d'ISDN et associé à une administration par voie orale de solution saline ou d'IEnk1 au 5eme jour.

Au total 76 animaux seront utilisés dans ce projet. Les procédures seront réalisées sur le rat mâle car le modèle ISDN n'est pas validé chez la femelle. De plus en fonction des résultats obtenus chez le mâle, la ou les molécules les plus efficaces seront sélectionnées pour être testées ultérieurement chez la femelle ce qui permettra de réduire le nombre de groupes et d'animaux dans ce dernier cas.

Afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie...mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection léthale d'anesthésique. Tous les animaux seront mis à mort à la fin des procédures par injection léthale d'anesthésique.

14153 La douleur neuropathique est consécutive à une lésion ou une pathologie du système nerveux. Elle affecterait, en France, environ 6% de la population. Certains antidépresseurs et anticonvulsivants représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles. Cependant ils ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux, conduisant beaucoup de patients à arrêter leur traitement. Le mécanisme d'action de ces deux classes pharmacologiques dans le soulagement de la douleur neuropathique est, pour l'heure, encore mal connu. On sait que des mécanismes neuroinflammatoires sont associés aux douleurs neuropathiques. Des résultats récents suggèrent que les traitements par antidépresseurs ou anticonvulsivants utilisés pour traiter les douleurs neuropathiques ne touchent qu'indirectement ces mécanismes. Une stratégie thérapeutique les ciblant plus directement pourrait améliorer la prise en charge des patients. Plusieurs études montrent que les mécanismes neuroinflammatoires s'accompagnent parfois d'une surexpression de certaines protéines transmembranaires impliquées dans la communication intercellulaire. Des molécules inhibitrices de ces protéines membranaires ont déjà été identifiées comme ayant des propriétés antinociceptives (elles arrêtent/limitent la sensibilité à la douleur). L'entreprise, avec laquelle ce projet est effectué, développe des combinaisons innovantes de molécules à visée thérapeutique en psychiatrie et neurologie. Dans ce projet, l'objectif est d'associer un antidépresseur avec une molécule inhibitrice des protéines transmembranaires en question, afin d'amplifier l'action de l'antidépresseur et de diminuer sa dose efficace.

L'objectif de ce projet est donc de comprendre le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) à l'action thérapeutique de cette combinaison afin de valider de nouvelles voies de traitement.

Il n'existe pas de méthodes alternatives au recours de modèles animaux pour réaliser un tel projet : aucun modèle *in vitro* ou *in silico* ne permet de reproduire et suivre l'effet de l'administration d'une molécule sur l'activité du cerveau. Il sera nécessaire d'administrer les différentes molécules testées à des animaux (souris) vigiles afin qu'elles puissent induire leurs effets sur le cerveau. Les effets des traitements sur le cerveau seront étudiés par imagerie et les acquisitions seront réalisées sous anesthésie générale. L'imagerie permet d'étudier l'effet des traitements dans l'ensemble des régions cérébrales en un seul examen. Cela permet de vérifier plusieurs hypothèses à partir d'un même groupe d'animal. Nous réduirons chaque fois que possible le nombre d'animaux pour optimiser les procédures. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout inconfort. Le protocole nécessite l'utilisation d'un modèle validé de douleur neuropathique chez la souris afin de pouvoir évaluer de nouveaux traitements. Une attention

particulière sera donc portée au suivi de sensation de douleur. Ainsi, des tests et un suivi particulier seront mis en place afin de limiter la sensation de douleur en deçà d'un niveau acceptable (point-limite) sans pour cela compromettre l'expérience. Les animaux seront hébergés en cage collective avec des enrichissements permettant d'optimiser leur bien-être. Au regard des données de la littérature et la variabilité interindividuelle, explorant les actions des traitements de la douleur neuropathique, 60 animaux répartis en 6 groupes seront nécessaires pour mener un projet visant à établir l'efficacité thérapeutique d'une combinaison de médicaments (antidépresseur +/- molécule inhibitrice des protéines transmembranaires). Nous prévoyons d'étudier 3 combinaisons de médicaments au cours des 5 prochaines années, pour un total de 180 animaux.

14154 La dermatite atopique et le psoriasis sont deux pathologies cutanées très répandues dans le monde dont la prévalence est élevée et en constante augmentation. Les traitements actuels reposent majoritairement sur l'application de corticoïdes topiques aux nombreux effets secondaires. Le développement d'une nouvelle méthode d'immunothérapie est donc une nécessité dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients. L'innovation porte sur la mise au point d'anticorps thérapeutiques dirigés contre des cibles spécifiques impliquées dans ces maladies. Le projet a pour but de développer un traitement d'immunothérapie cutanée de la dermatite atopique et du psoriasis. Afin de déterminer l'efficacité du traitement, la souris constitue un modèle indispensable pour le développement des signes cliniques de ces deux maladies. En effet, les cellules isolées en culture ne peuvent que très partiellement refléter la réponse d'un tissu ou d'un organe complet. Le modèle sera mis au point selon les données déjà publiées et le traitement sera administré par voie cutanée. L'efficacité du traitement sera évaluée par analyses biochimiques sanguines, et après sacrifice de l'animal, sur des analyses histologiques et des analyses de biologie moléculaire. Ce projet utilise au total 300 souris. Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : Le développement des signes cliniques de la dermatite atopique et du psoriasis n'est pas transposable *in vitro*. En effet, les modèles *in vitro* actuels ne peuvent que très partiellement refléter la réponse d'un tissu ou d'un organe complet. L'induction de la maladie chez la souris va permettre de démontrer l'efficacité d'une application topique d'anticorps dirigés contre les molécules inflammatoires impliquées dans ces deux pathologies. **Réduire** : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les protocoles d'induction des maladies seront préalablement mis au point sur un nombre limité de souris. Les expériences seront réalisées dans un ordre précis et avec des témoins choisis de manière à réduire le nombre d'expériences.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, analgésique post opératoire).

14155 Lors du développement d'un nouveau médicament à usage humain, il est indispensable de connaître ses propriétés pharmacologiques et son comportement dans un organisme.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule ou d'une combinaison de nouvelles molécules chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Dans ce projet, des prélèvements sanguins de faible volume et peu fréquents permettront de doser la concentration plasmatique du médicament et de suivre son évolution chez le primate non humain. Les effets secondaires associés à l'administration d'une nouvelle molécule ou d'une combinaison de nouvelles molécules peuvent également être qualitativement et quantitativement étudiés en fonction du temps.

L'utilisation du modèle primate se justifie par la spécificité des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez eux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiologiques chez l'Homme. De plus, les procédures de ce projet permettront

d'établir une stratégie de prédiction de la biodisponibilité de chaque molécule chez l'Homme et/ou d'évaluer leurs effets dont la finalité est d'ajuster la dose administrable à l'Homme.

Durant la période couverte par ce projet, il est prévu d'utiliser 50 macaques cynomolgus par an (soit un total de 250 pour 5 ans), 10 vervets par an (soit un total de 50 pour 5 ans) et 10 macaques rhésus par an (soit un total de 50 pour 5 ans). Ces animaux seront tous issus d'un élevage agréé. Pour chaque procédure réalisée, il sera veillé à utiliser un nombre minimal et suffisant d'animaux pour que les résultats soient interprétables et transposables à l'Homme.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements ainsi qu'entre les administrations de la ou des molécule(s) étudiée(s). Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront déterminées au préalable de la réalisation de chaque procédure. Ceci sur la base des données préliminaires recueillies sur la molécule et ses effets. Dans le cas où les animaux feront l'objet d'une réutilisation, un avis vétérinaire sera obligatoire pour justifier du bon état de santé de l'animal. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

14156 La chimiothérapie est utilisée dans le traitement de nombreux cancers. Les agents chimio thérapeutiques classiques éliminent les cellules qui se divisent comme les cellules cancéreuses, mais ils sont aussi actifs sur les cellules normales de l'organisme qui se divisent rapidement comme les cellules du tube digestif, du sang et de la peau. Cette action est responsable des effets secondaires négatifs de la chimiothérapie. Il est nécessaire de trouver des agents anticancéreux de nouvelle génération qui ciblent les cellules cancéreuses et épargnent les cellules normales. Le but de ce projet est de tester les propriétés anti-cancéreuses d'un nouvel agent chimio thérapeutique dans un modèle préclinique de cancer chez la souris. Pour créer des tumeurs chez l'animal, des cellules tumorales seront greffées à des souris immunodéficientes, puis ces souris seront traitées avec cet agent durant plusieurs semaines. Le développement tumoral sera mesuré sur animaux vivants par une technique d'imagerie sensible et non invasive. A l'issue de l'expérience, les tumeurs seront prélevées et la réponse thérapeutique sera évaluée.

La réalisation du projet s'attache à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, le suivi dans le temps de la croissance tumorale par des examens non invasifs permet d'utiliser le même animal du début à la fin de l'expérience et en conséquence de réduire le nombre d'animaux. Afin de remplacer au maximum l'utilisation d'animaux, des travaux en amont ont été réalisés au laboratoire sur des cellules cancéreuses en culture. Ces essais permettent d'avoir une idée précise de la dose optimale active qui sera directement transposée chez l'animal. De plus, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux comme certaines injections sera réalisé sous anesthésie permettant le raffinement de l'étude. L'ensemble du projet nécessitera 160 souris.

14157 Le syndrome de Netherton (SN) est une maladie génétique cutanée rare dont l'incidence est estimée à 1/200000. Il est caractérisé par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale (dermatose inflammatoire génétique), une anomalie capillaire et des manifestations atopiques (allergiques). Ces symptômes sont présents dès la naissance, entraînant des infections bactériennes, une déshydratation, une hypothermie et une perte de poids extrême et sont à l'origine d'un taux de mortalité postnatal élevé. Ces symptômes conduisent à une inflammation sévère de la peau évoluant par poussées ayant un fort impact sur la qualité de vie des personnes atteintes. Jusqu'à présent, il n'existe pas de traitement efficace pour les sujets atteints du SN. Des études récentes utilisant des échantillons de peau de patients SN ont établi la présence d'une infection à la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* dans 100% des cas observés. L'infection de la peau par *S. aureus* est un facteur qui augmente la sévérité de la maladie SN. Cibler l'infection par *S. aureus* peut donc être un moyen de prévenir les lésions tissulaires induites par l'inflammation dans la maladie SN.

L'analyse des mécanismes moléculaires qui interviennent dans l'infection de la peau des patients SN par *S. aureus* permettra d'identifier des cibles thérapeutiques pour cette maladie. L'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiés, mimant le plus fidèlement possible les symptômes du SN, permettra d'effectuer de telles analyses mécanistes. Nous allons utiliser 3 modèles différents de la maladie SN, dont un inductible, afin d'infecter leur peau avec une souche pathogène de *S. aureus* et d'évaluer le phénotype de la maladie SN au niveau cellulaire et moléculaire.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R, un nombre minimal d'animaux sera donc utilisé. Dans ce projet, un total de 148 animaux est estimé pour une durée de 5 ans. Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour obtenir des résultats analysables, en incluant les répétitions indispensables à la démonstration. Pour éviter toute souffrance ou angoisse liées à la procédure, l'infection cutanée par *S. aureus* sera réalisée sous anesthésie générale. Des antalgiques seront prévus en pré- et post- prélèvement et si des signes de douleur apparaissent. Une surveillance 3 fois par semaine sera effectuée. De plus, un enrichissement du milieu sera effectué par l'ajout de maisonnettes en cartons ou de coton pour la nidation et de bâtonnets en bois à ronger. Enfin, des points limites adaptés ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats précliniques de ce projet permettront de développer de nouvelles thérapies ayant le potentiel d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

14158 Ces activités expérimentales pédagogiques sont réalisées sur des souris dans le cadre de séances de travaux pratiques de physiologie animale. Ce projet vise à appréhender d'une manière pratique les effets de certains psychotropes sur les comportements moteurs, mnésiques et les capacités exploratrices des souris. Il permet une illustration pratique des cours réalisés en licence de Biologie.

La réglementation sur l'utilisation des animaux est enseignée dans le cadre de l'UE et une sensibilisation particulière est faite sur la règle des 3R et le bien-être animal.

Ce projet utilise 300 animaux.

La procédure consiste à injecter des psychotropes en intrapéritonéale aux souris et ensuite observer à l'aide de tests comportementaux de références les effets sur les fonctions motrices et mnésiques.

Cette procédure est de classe légère et aucune souffrance n'est infligée aux animaux. Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacer: aucun modèle *in vitro* ne permet d'explorer les régulations motrices et mnésiques observées chez l'animal. Les modèles murins sont des modèles de référence pour observer ces phénomènes chez l'homme.

Réduire: le nombre des animaux est réduit à son maximum (3 souris pour un trinôme d'étudiants) et les résultats des différents groupes d'étudiants sont mutualisés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables dans le cadre de l'analyse de données réalisées.

Raffiner: Les enseignants sensibilisent les étudiants au bien-être animal et imposent des manipulations réalisées avec des gants et dans le plus grand calme. Les animaux sont présents dans la salle de travaux pratiques uniquement pendant les tests afin de limiter au maximum le stress. Les produits injectés en intra-péritonéal sont mis à température ambiante et les seringues utilisées sont de type insuline afin de ne pas induire de souffrance aux animaux lors de l'injection. Les injections sont réalisées par du personnel qualifié et compétent (animalier formé).

14159 Dans une étude antérieure nous avons testé des candidats médicamenteux dans un modèle xénogénique de greffe contre l'hôte (GVHD) sur des souris NSG humanisées avec PBMCs humains. Les résultats de cette étude nous ont permis de sélectionner deux candidats qui semblent meilleurs.

Dans cette étude nous souhaitons tester nos deux molécules dans un modèle de rejet d'allogreffe chez la souris NSG humanisée avec des PBMCs humains afin d'évaluer dans une première partie leur effet sur la survie, et étudier par la suite leur mécanisme d'action.

Ce modèle d'allogreffe sera induit par une greffe de peau humaine chez la souris NSG suivi d'une injection après quelques jours avec des cellules humaines allogéniques (PBMCs : mononuclées de sang périphérique)

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

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de la molécule dans un modèle *vivo* proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux est de 200, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 5 groupes (20 souris/groupe). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus, nous envisageant donc de faire trois groupes témoins, un groupe de souris non greffées, un groupe de souris greffées sans PBMCs et un groupe de souris greffées avec de la peau humaine et des PBMCs mais traitées avec de l'isotype contrôle, les deux autres groupes ils recevront chacun de nos candidats médicamenteux.

-Raffiner : A partir de J0, les souris seront surveillées quotidiennement pour leur poids ainsi que le score clinique, les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être (cf fichier annexe). Les conditions d'hébergement et d'enrichissement sont standards à l'espèce, les souris seront par groupe social de 5 maximum par cage ventilée sur un portoir à l'animalerie, avec des moyens d'enrichissement (des tunnels, et des bouts de papiers).

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de la GVHD et/ou du rejet de greffe (la peau humaine) ; des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG.

Tous les animaux traités et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVHD et dans le greffon (la peau humaine), et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de nos anticorps humains sur les réponses immunes intervenant dans des contextes d'allotransplantation, et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées et non traitées.

14160 L'objectif de l'étude est de démontrer l'intérêt des cellules stromales mésenchymateuses isolées du corps adipeux de la bouche (CAB) comme traitement innovant de l'ostéonécrose de la mâchoire. Les cellules stromales mésenchymateuses sont des cellules présentes dans le tissu adipeux et qui ont la capacité de se différencier en cellules impliquées dans la réparation osseuse et qui sont également capables de moduler l'inflammation tissulaire.

L'ostéonécrose de la mâchoire est une exposition d'une surface osseuse de la région maxillo-faciale qui ne cicatrise pas après au moins 8 semaines de dénudation et qui est due à une mauvaise réparation osseuse. Cette pathologie est souvent associée à une infection et à une inflammation importante de la zone lésée entraînant des douleurs chroniques chez les patients ainsi qu'une altération de leur qualité de vie. A l'heure actuelle, les modalités de prise en charge de cette pathologie combinent la prise d'antibiotique, afin de limiter l'infection de la zone lésée, et un traitement anti-inflammatoire permettant de contrôler la douleur. Cependant, des études chez l'animal ont montré que les cellules stromales mésenchymateuses issues du tissu adipeux abdominal (ASCs) favorisent la reconstruction osseuse après ostéonécrose et pourraient être un nouveau traitement pour cette pathologie. Or, le corps adipeux de la bouche est un tissu adipeux profond de la face qui est riche en cellules stromales mésenchymateuses (CAB-ASCs) et qui présente une origine développementale identique à celle des structures maxillo-faciales. De plus,

des études ont montré que les cellules stromales mésenchymateuses du CAB présentent une capacité de différenciation ostéoblastiques similaires à celle des cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux abdominal (T. Shiraishi, J. Dent. Res., 2012). Il nous semble donc important de vérifier si ceci est également vrai *in vivo*. C'est pourquoi, la mise en place d'un modèle de lésion osseuses de taille critique de la calvaria chez la souris Nude ou C57BL/6 est essentielle pour nous permettre de répondre à cette question afin de déterminer si les CAB-ASCs pourraient représenter un traitement plus adapté et plus efficace comme support à la reconstruction et à la revascularisation de l'os alvéolaire en comparaison aux ASCs du tissu adipeux abdominal.

Pour ce projet, nous utiliserons 1655 souris Nude et 1655 souris C57BL/6 qui nous permettront d'évaluer la reconstruction osseuse, par tomодensitométrie et par analyse histologique, et d'évaluer la réponse immunitaire induite par les différents traitements. Pour l'ensemble des protocoles décrits ci-dessous, nous avons déterminé le nombre de souris maximal nécessaire pour obtenir des résultats significatifs. Des conditions optimales d'expérimentation seront appliquées afin de limiter au maximum la souffrance de l'animal et afin de préserver son bien-être. Ainsi, les animaux seront placés sous antalgiques avant et 5 jours après la chirurgie. L'évaluation de la cicatrisation de la plaie au niveau du crâne sera effectué 1 fois par jour et les animaux seront également observés 1 fois par jour à la recherche des signes indicatifs de douleur comme posture anormale, difficulté de ventilation ou trouble de comportement de type d'automutilation. Au moindre signe de dégradation de l'animal, ce dernier sera sorti de l'étude.

14161 Ce projet a pour but d'évaluer l'implication de la protéine TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) dans l'accumulation du domaine extracellulaire de Notch3 (Notch3ECD) autour des petits vaisseaux cérébraux. Cette étude nous permettrait d'avancer dans la compréhension de la pathogénèse du CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy).

Le CADASIL est le type le plus fréquent de SVD (small vascular diseases). CADASIL est causé par une mutation située dans le gène NOTCH3 sur le chromosome 19. Ce gène code pour un récepteur transmembranaire impliqué dans le développement embryonnaire. Ce récepteur est retrouvé sur la surface des cellules musculaires lisses des artères. Cette mutation provoque une accumulation pathologique du récepteur NOTCH3 dans l'espace périvasculaire des petites et moyennes artères cérébrales, qui est responsable de la pathogénèse et de la présentation phénotypique de CADASIL. De cette accumulation résulte un épaississement et une fibrose de la paroi de ces petites et moyennes artères causant la survenue d'infarctus cérébraux.

Il existe des modèles murins de CADASIL qui ont permis d'apporter des éléments uniques de physiopathologie, maintenant confirmés chez l'homme. On observe ainsi la formation d'agrégats périvasculaires du domaine extracellulaire de la protéine Notch3 (Notch3ECD) avec certaines molécules de la matrice extracellulaire, dont TIMP3. Ces agrégats précèdent la mise en place de dépôts de matériels granulaires osmiophiles (GOM) visibles en microscopie électronique, et pourraient donc y contribuer. L'invalidation de TIMP3 améliore le profil clinique des animaux dans un modèle TgNotch3R169C de CADASIL sans affecter la formation et le nombre de dépôts GOM. TIMP3 pourrait donc contribuer également à la maladie.

Dans un modèle murin de CADASIL, il a été montré que la diminution de l'expression de TIMP-3 favorisait le rétablissement de certains paramètres physiologiques comme le débit sanguin cérébral, la pression artérielle et le diamètre passif des petits vaisseaux. Dans le cadre de notre projet, nous souhaitons nous intéresser plus particulièrement au(x) rôle(s) de TIMP-3 dans la physiologie des petits vaisseaux cérébraux chez la souris. Plus spécifiquement, nous souhaitons définir l'impact de TIMP3 périvasculaire, sur la réactivité des vaisseaux cérébraux. Pour répondre à cette question, nous utiliserons le paradigme de stimulation des vibrisses pour évaluer le couplage neurovasculaire après injection dans le liquide céphalorachidien de la forme recombinante de la protéine TIMP-3.

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

pathologies neurovasculaires. L'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sont donc parfaitement connues. De plus il y a déjà de nombreuses données sur le CADASIL chez la souris, notre projet se situe dans la continuité de ces études.

Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal anesthésié. Nous nous basons sur notre connaissance de la spécificité/sensibilité de nos méthodes pour s'assurer d'utiliser le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. Les animaux seront hébergés en petits groupes sociaux stables (n=5) avec un enrichissement minimum (coton, petite maison-dôme en cellulose à usage unique et d' « ALPHA-dri » (Litière absorbante à base de cellulose vierge), et leur manipulation sera assurée que par du personnel expérimenté. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids ...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. Les animaux seront maintenus dans des conditions optimales d'hébergement, dans un environnement stabilisé en température (21°C), hygrométrie (55%), luminosité (100lux) et durée du cycle de lumière (12/12). Le raffinement de notre protocole et l'utilisation du couplage neurovasculaire comme index fonctionnel contribuent à réduire le nombre d'animaux.

Au total ce projet utilisera un maximum de 80 souris.

14162 L'insuffisance rénale chronique (IRC) est associée à une mortalité cardiovasculaire très importance. Le risque de maladie cardiovasculaire est en effet multiplié par 20 chez les insuffisants rénaux au stade terminal de la maladie comparée à des individus non insuffisants rénaux. Peu de données sont toutefois disponibles dans la littérature pour expliquer le développement de la « cardiopathie urémique », c'est-à-dire d'une dysfonction cardiaque résultant de la maladie rénale. Nous faisons l'hypothèse que le défaut de fonction rénale provoque l'accumulation de certains composés toxiques (appelés toxines urémiques) qui favorisent le développement des maladies cardiovasculaires et pourraient se révéler toxiques pour le cœur. L'une de ces toxines, nommée Indoxyl Sulfate (IS), produite par le microbiote intestinal pourrait se révéler extrêmement toxique pour le cœur. En effet, *in vitro* cette toxine a des effets délétères sur le cœur. La toxicité de ce composé est médiée par son interaction avec un cible moléculaire nommée Arylhydrocarbon Receptor (AhR). Ce récepteur est déjà connu pour médier l'effet toxique de certain polluants environnementaux (comme par exemple les dioxines) et son activation est associé à la survenue d'événements cardio-vasculaires. L'objectif de ce projet est d'étudier *in vivo* si l'IS, pourrait favoriser la dysfonction cardiaque par l'activation du récepteur AhR ou en stimulant l'inflammation. Dans ce but, un modèle souris d'IRC (induit chirurgicalement) et des souris contrôles seront exposées à l'IS pendant 10 semaines afin d'obtenir des taux plasmatiques comparables à ceux observés chez les patients IRC terminaux et d'en étudier l'impact cardiaque. Nous analyserons pour cela divers marqueurs biochimiques ou tissulaires et mènerons des explorations fonctionnelles cardiaques en échocardiographie. Comprendre les médiateurs impliqués dans la cardiopathie urémique pourrait permettre l'identification de cibles thérapeutiques pour diminuer les concentrations plasmatiques d'IS et prévenir les complications cardiaques associées à l'IRC.

Le présent protocole expérimental implique l'utilisation d'un total de 60 souris de laboratoire. La méthode chirurgicale mise en œuvre pour induire la maladie rénale chez la souris est une procédure très bien maîtrisée. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine du risque cardio-vasculaire accru des patients IRC et ainsi d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant ces anomalies (tel le blocage du récepteur AhR si nos expériences confirment son rôle).

Conformité à la règle des 3 R:

S'agissant d'une maladie systémique (insuffisance rénale chronique), toutes les expérimentations réalisables *in vitro* ont déjà été mises en œuvre et il nous est à présent nécessaire de recourir à une expérimentation sur animal entier. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude (60 souris) a toutefois été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Le protocole chirurgical sera réalisé sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane offrant à la fois une bonne sécurité anesthésique et un bon confort anesthésique. Un protocole d'analgésie (associant anesthésie

locale per-opératoire et l'usage de dérivés morphiniques) et un système de scoring permettra, de prévenir et de contrôler efficacement les douleurs post-opératoires. La fonction cardiaque sera évaluée de façon totalement non-invasive par échocardiographie chez des animaux légèrement sédatisés au butorphanol. L'indoxyl-sulfate sera administré dans l'eau de boisson afin d'éviter des injections quotidiennes. Les conditions d'hébergement sont adaptées aux besoins des souris (température, enrichissement du milieu de vie avec du coton permettant au souris de se fabriquer un nid et des tunnels,).

14163 Le maintien d'un organe et la régénération tissulaire repose sur l'existence de cellules particulières appelées cellules souches. Ces cellules existent dans les tissus adultes et ont récemment été identifiées dans des "zones de transition". Ces régions représentent la jonction entre deux types d'épithélium et de façon intéressante sont le siège privilégié du développement de carcinomes squameux qui font partie des cancers les plus abondants et agressifs chez l'homme. Par exemple, au niveau du col de l'utérus, les cancers apparaissent exclusivement à la jonction du vagin et de la région cervicale. Dans les cancers de l'anus, les tumeurs présentes dans la zone de transition anorectale sont trois fois plus fréquentes et le pronostic moins favorable que les cancers retrouvés dans le canal anal. Enfin, dans les cancers de l'œsophage la zone de transition entre l'œsophage et l'estomac est souvent affectée. Les connaissances actuelles dans ce domaine sont basées largement sur des études de cas humains et limitées à des évidences descriptives et corrélationnelles ne permettant pas de définir les mécanismes moléculaires impliqués.

Nous avons créé des modèles animaux uniques que nous utiliserons pour étudier et suivre les cellules présentes dans les zones de transition. L'hébergement de nos souris se fera en confinement adapté à la stabulation et au travail avec les lignées murines immunodéprimées (Cages individuellement ventilée : sealseafe plus TECHNIPLAST). La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Les locaux d'hébergement et les postes d'expérimentation chirurgicale sont séparés. Les souris de ce projet sont hébergées en groupe (enrichissement social) et un enrichissement complémentaire consistera dans l'ajout de « copeaux compressés » (Nidification). Lors des phases opératoires, outre l'anesthésie durant la chirurgie, en matière de raffinement nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur et souffrance. Nous utiliserons des méthodes alternatives pour valider les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, incluant des méthodes de cultures tridimensionnelles de type organoïdes. Cependant, les cellules placées en culture peuvent changer de propriétés justifiant l'utilisation d'essai *in vivo* chez la souris pour pouvoir obtenir des conclusions significatives. Ce projet utilisera des souris génétiquement modifiés élevés dans le laboratoire, (20 individus/an) et des souris immunodéficientes de type NOD/SCID (120 individus/an) soit 700 individus sur 5 ans.

14164 La glycogénose de type 1a est une maladie génétique rare caractérisée par une incapacité de l'organisme à produire du glucose (sucre) pour maintenir leur glycémie (taux de sucre dans le sang) entre 2 repas. La maladie se caractérise par des hypoglycémies sévères qui apparaissent rapidement après un repas. De plus, les patients ont un gros foie dû à un stockage trop important de sucres et de graisses et développent à l'âge adulte des tumeurs hépatiques. Actuellement, un contrôle nutritionnel très strict permet de limiter les hypoglycémies et la transplantation hépatique est requise dans certains cas comme lors de l'apparition de carcinomes hépatiques. En l'absence de traitement curatif, la thérapie génique est un espoir de traitement pour cette maladie. Elle permettrait de guérir cette maladie génétique en apportant le gène « médicament » dans les cellules du foie grâce à des vecteurs viraux. Les vecteurs injectés dans la circulation sanguine sont utilisés comme moyen de transport du gène à corriger et sont capables de franchir toutes les barrières biologiques de la cellule jusqu'au noyau. Ils sont généralement dérivés de virus, notamment des virus adéno-associés appelés AAV. Les vecteurs AAV permettent de cibler efficacement les cellules du foie mais ne s'intègrent pas au génome de la cellule.

Les études actuelles réalisées dans des modèles animaux de glycogénose de type 1a montrent une efficacité des vecteurs AAV mais une perte du gène « médicament » est observée au cours du temps. Ceci peut s'expliquer par une multiplication anormale des cellules du foie dans cette

pathologie ce qui entraîne une perte des vecteurs au fil des divisions cellulaires. Pour éviter la perte d'efficacité de la thérapie génique, nous proposons de traiter le foie avant de débiter la thérapie génique. Les souris recevront au préalable un traitement permettant de limiter la division des cellules du foie. Pour réaliser cette étude, nous disposons d'un modèle animal reproduisant la glycogénose de type 1a en ciblant la perte de la production de glucose uniquement dans le foie. Ces animaux sont viables grâce à une production de glucose par deux autres organes, les reins et l'intestin. Nous étudierons l'efficacité d'une thérapie génique et le bénéfice d'un prétraitement sur la régulation de la glycémie au cours d'un jeûne court et sur le métabolisme et l'histologie du foie. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacement : La régulation de la glycémie implique une coordination de l'ensemble du métabolisme et est étroitement dépendante des variations hormonales ce qui exclut une approche en culture cellulaire. Il est donc important de disposer de modèles animaux viables reproduisant la glycogénose de type 1a et permettant de tester des approches thérapeutiques. Les vecteurs utilisés en thérapie génique ont été validés en cellules pour vérifier la bonne expression du gène médicament et l'absence de toxicité. Leur efficacité sera évaluée chez l'animal.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie et du métabolisme (utilisation des stocks de sucre du foie et régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'études précédentes. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes minimums de 6 souris seront analysés. Les souris issues de la reproduction et de mauvais génotype seront utilisées pour la reproduction ou comme souris contrôles dans le projet. Au total, un nombre maximum de 96 souris sera utilisé dans ce projet.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées en groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation et limiter au maximum le stress. Une attention particulière sera apportée sur l'accès à la nourriture qui sera facilité par la présence de croquettes dans la cage. Pour éviter le mal-être lié au développement d'une hypoglycémie, un suivi du comportement des souris selon une grille de critères définis (comportement de l'animal, mobilité, réaction à une stimulation, mesure de la glycémie si nécessaire) sera réalisé quotidiennement dès l'induction de la maladie et lors des mises à jeun. Afin d'éviter les risques d'hypothermie liés aux hypoglycémies, une partie de la cage sera placée sur un tapis chauffant lors des mises à jeun. De plus, tout animal en hypoglycémie sévère (inférieure à 30 mg/dl) sera injecté immédiatement avec une solution de glucose et renourri. Un anesthésique sera appliqué avant la prise de sang pour la mesure de la glycémie et des paramètres sanguins. Le traitement pharmacologique sera incorporé à la nourriture pour éviter le gavage ou des injections quotidiennes.

En conclusion, ce projet vise à améliorer l'efficacité de thérapie génique en associant un prétraitement des cellules du foie pour limiter leur division cellulaire et ainsi la perte du gène « médicament » au cours du temps. Au total, cette étude nécessitera au maximum 96 souris sur une durée de 2 ans.

14165 L'alimentation est essentielle à la survie mais est aussi source de plaisir. La libération du neurotransmetteur dopamine est un mécanisme central de l'activation des circuits de récompense par la consommation d'aliments au goût agréable. L'obésité est un trouble métabolique résultant d'un déséquilibre dans l'interaction entre les circuits homéostatiques et de récompense réglant l'alimentation. Des études cliniques ont établi que l'obésité est accompagnée d'une réduction de l'expression du récepteur à la dopamine D2 dans la partie dorsale du striatum. Ce phénotype a été associé au polymorphisme TaqIA sur le gène ANKK1, qui prédispose à la suralimentation et aux troubles métaboliques. Cependant, les fonctions d'ANKK1 restent inconnues.

Dans le but de mieux comprendre les différents aspects de la régulation du fonctionnement cérébral par le gène Ankk1, nous proposons d'établir une nouvelle lignée de souris chez laquelle la protéine Ankk1 ne sera plus produite spécifiquement dans les cellules du cerveau exprimant les récepteurs à la dopamine D2. Etant donné que cette procédure ne nécessite pas une modification du génome de la souris, mais juste d'un croisement de deux lignées déjà existantes et qui séparément n'ont

pas de phénotype, la nouvelle lignée de souris ne sera pas, à priori, susceptible de provoquer de phénotype délétère.

Cependant, les croisements étant réalisés pour la première fois, les animaux de cette lignée seront observés attentivement dès leur naissance et pendant toute la durée de leur vie pour s'assurer qu'ils ne développent pas de phénotype dommageable. Les souris seront hébergées dans des cages de surface - au minimum - égale aux recommandations en vigueur, dans un environnement enrichi d'igloos et de cotons, par fratries du même sexe, avec nourriture et eau ad libitum.

L'établissement de cette ligne nous permettra de découvrir les fonctions d'ANKK1 et ouvrira la voie à la compréhension de la physiopathologie des phénotypes d'obésité et dépendance alimentaire associés à la TaqIA tout en offrant une cible moléculaire pour lutter contre la perte du contrôle alimentaire. En réduisant au maximum le nombre d'animaux afin d'avoir des résultats de comportement fiable, nous prévoyons l'utilisation de 800 souris au cours des 5 prochaines années.

Nos protocoles sont mis au point de façon à veiller au bien-être animal, absolument crucial dans des études de comportement, en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé afin d'être en adéquation avec la règle éthique des 3 R, remplacer, réduire et raffiner : notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins adéquats par antalgie si nécessaire, et enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort ; et nous réduisons au maximum nos effectifs de souris afin d'avoir des résultats fiables. Cette expérience ne peut être remplacée car nous avons besoin de voir la régulation du fonctionnement cérébral par le gène Ankk1.

14166 La stéatose hépatique est une maladie bénigne qui se caractérise par une accumulation de gras dans les cellules composant le foie. Elle peut résulter de différentes étiologies, tel qu'une trop grande consommation d'alcool, d'un dérèglement métabolique, de l'ingestion de toxines ou de médicaments. Actuellement, 25 à 30% de la population mondiale souffre de stéatose, c'est-à-dire que plus de 5% de leurs hépatocytes accumulent de la graisse. Cette forte prévalence est directement en lien avec la pandémie de diabète et d'obésité qui caractérise nos sociétés industrialisées, pandémie qui découle de notre alimentation trop riche en sucre et en graisse et de notre sédentarité. Cette maladie est alors dénommée stéatose non liée à l'alcool, ou NAFLD, sa prévalence déjà forte est en constante augmentation. Elle est aujourd'hui la maladie la plus fréquente des pays développés. La stéatose est souvent considérée comme une maladie bénigne car réversible et donc soignable par un simple régime alimentaire accompagné d'une activité physique régulière. Le plus souvent, cette réversion n'est que partielle voire inexistante et de nombreux patients vont développer une maladie chronique qui peut évoluer en stéatohépatite non liée à l'alcool (NASH), en cirrhose et en cancer du foie. Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la progression de la stéatose simple vers une pathologie hépatique plus sévère restent mal définis. Notre projet a pour objectif de déterminer l'implication physiopathologique du stress oxydatif et plus spécifiquement des altérations oxydatives des protéines de l'environnement extracellulaire d'un foie présentant une stéatose non liée à l'alcool. Notre hypothèse est que la quantité et la qualité des protéines composant l'environnement extracellulaire favorisent l'aggravation des maladies inflammatoires chroniques du foie. L'identification du protéome (nature des protéines présentes) et de l'oxydoprotéome (protéines oxydées et nature de l'oxydation) nous permettra de caractériser les voies de signalisation responsable de l'évolution de la maladie. Cette hypothèse repose sur des résultats obtenus au laboratoire démontrant que REG3A est un puissant anti-oxydant présentant la capacité de piéger les radicaux libres de l'oxygène (ROS) de type hydroxyle dans l'environnement extracellulaire hépatique. Cette réduction du stress oxydatif extracellulaire induite par REG3A en condition inflammatoire est suffisante pour guérir une insuffisance hépatique chez la souris et chez l'homme suggérant que l'accumulation de protéines oxydées dans l'environnement extracellulaire joue un rôle majeur dans le développement des lésions tissulaires, limitant la réparation et la régénération du foie. Le versant extracellulaire du stress oxydatif n'est à ce jour que très partiellement étudié. Dans le cas précis de ce projet, le modèle animal expérimental est indispensable devant l'absence de modèle cellulaire d'étude de la matrice extracellulaire hépatique normale et inflammatoire. Les protéines composant

l'environnement extracellulaire, qu'elles soient structurales ou associées à la matrice, sont produites par les différents types cellulaires du foie (hépatocytes, cholangiocytes, cellules stellaires, etc...), les cellules immunes résidentes ou non du foie, et par des organes à distance tel que le système nerveux central, le pancréas et le tractus digestif. Il n'est pas possible de reproduire une telle diversité *in vitro*. Afin d'identifier les protéines de l'environnement extracellulaire basal et inflammatoire, leurs modifications oxydatives et les voies de signalisation intracellulaire qu'elles régulent, nous avons choisi un modèle animal expérimental d'étude de la stéatose non liée à l'alcool reconnu par la communauté scientifique. Il s'agit d'un modèle non invasif basé sur une alimentation riche en sucre et en graisse. Nous proposons d'utiliser ce modèle expérimental de stéatose hépatique pour 3 lignées de fond génétique commun C57BL/6N : 1 lignée de souris sauvage contrôle (WT), 1 lignée de souris knockout (RGE3A-KO) pour l'homologue murin du gène codant la lectine REG3A et 1 lignée transgénique (REG3A-TG) exprimant constitutivement la lectine. Lors de l'élaboration de notre projet, nous avons pris en compte la règle des 3R. Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer le modèle animal dans cette expérimentation par une méthode alternative. Cependant, ce programme de recherche a nécessité plus d'une année d'étude préparative afin d'établir toutes les procédures techniques permettant la purification des protéines composant l'environnement extracellulaire, la purification des protéines carbonylées de ces fractions subcellulaires et leur analyse par masse spectrométrie. Ce travail a été réalisé sur des échantillons de tissu hépatique de souris provenant de projets antérieurs achevés. Réduire : Afin d'être sûr de n'inclure dans l'étude que le nombre d'animaux strictement nécessaire pour obtenir des résultats significatifs, un calcul d'effectif avec une puissance de 0,95 a été réalisé. Les 3 lignées utilisées sont de même fond génétique ce qui permet de réduire le nombre de contrôles et d'assurer une meilleure reproductivité des résultats en ayant un échantillon le plus représentatif possible avec un nombre d'animaux réduit. Raffiner : Nous allons mettre en place une surveillance individuelle 1 fois par jour pendant toute la durée de l'expérimentation afin de détecter une souffrance éventuelle des animaux. Nous allons chercher à réduire le plus possible les manipulations impliquant la contention des animaux en y préférant l'utilisation de boîtes stériles, par exemple, pour les pesés. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être. Un total de 240 souris seront utilisées sur une période de cinq ans. Le régime alimentaire des souris n'induit aucune douleur, et n'induit aucune autre maladie qu'une obésité modérée associée à une stéatose hépatique.

14167 Le maintien d'un organe et la régénération tissulaire reposent sur l'existence de cellules particulières appelées cellules souches. Ces cellules existent dans les tissus adultes et ont récemment été identifiées dans des "zones de transition". Ces régions représentent la jonction entre deux types d'épithélium et de façon intéressante sont le siège privilégié du développement de carcinomes squameux qui font partie des cancers les plus abondants et agressifs chez l'homme. Dans les cancers de l'anus, les tumeurs présentes dans la zone de transition anorectale sont trois fois plus fréquentes et le pronostic moins favorable que les cancers retrouvés dans le canal anal. Les connaissances actuelles dans ce domaine sont basées largement sur des études de cas humains limitées à des évidences descriptives et corrélationnelles et ne permettant pas de définir les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons créé des modèles animaux uniques qui développent des cancers dans des zones de transition que nous utiliserons pour investiguer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'initiation et le maintien de ces tumeurs. L'hébergement de nos souris se fera en confinement adapté à la stabulation et au travail avec les lignées murines immunodéprimées (Cages individuellement ventilée : sealfsafe plusTECHNIPLAST). La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Les locaux d'hébergement et les postes d'expérimentation chirurgicale sont séparés. Les souris de ce projet sont hébergées en groupe (enrichissement social) et un enrichissement complémentaire consistera dans l'ajout de « copeaux compressés » (Nidification). Lors de la phase opératoire, outre l'anesthésie durant la chirurgie, en matière de raffinement nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur et souffrance. Nous utiliserons des méthodes alternatives pour valider les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, incluant des méthodes de cultures tridimensionnelles de type organoïdes. Cependant, les cellules placées en culture peuvent

changer de propriétés justifiant l'utilisation d'essai *in vivo* chez la souris pour pouvoir obtenir des conclusions significatives. Ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées élevées dans le laboratoire 450 individus sur 5 ans.

14168 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

A l'heure actuelle, les pathologies dégénératives au niveau des vertèbres cervicales du cou (hernie discale symptomatique avec myélopathie ou discarthrose compliquée de névralgie cervico-brachiale) ou traumatiques (entorse grave, fracture articulaire, luxation cervical) sont souvent traitées par arthrodèse (fusion entre deux vertèbres). Les techniques utilisées sont nombreuses parmi lesquelles l'implantation d'un greffon osseux, l'utilisation de systèmes d'ostéosynthèse (plaque métallique et vis) fixés entre les vertèbres concernées ou l'implantation entre deux vertèbres de structures artificielles appelées cages intersomatiques. Ces différentes techniques nécessitent souvent d'être associées.

Le produit à tester lors de ce projet est une cage intersomatique de fusion cervicale, possède une structure permettant de restaurer une hauteur discale et une stabilité et une composition favorisant l'ostéogénèse et l'ostéoconduction nécessaires à la réalisation d'une bonne fusion cervicale sans nécessité d'un greffon osseux et donc sans nécessité d'une chirurgie invasive de prélèvement du greffon. Les ovins représentent le modèle le plus approprié compte tenu de ses similitudes anatomiques et mécaniques entre son rachis et celui humain.

Ce projet de recherche appliquée, d'une durée de 12 mois maximum, prévoit un nombre maximum de 26 brebis. La procédure de classe modérée, vise à étudier par imagerie de tomodensitométrie (ou imagerie Scanner X) la régénération osseuse et la fusion cervicale au niveau des sites d'implantation du produit à tester.

L'implantation du produit à tester chez la brebis nécessite la réalisation d'une chirurgie invasive comprenant une discectomie par voie antérieure au niveau de 2 espaces intercervicaux.

Après la dernière session d'imagerie, chaque animal sera euthanasié afin de prélever les sites d'implantation pour analyses histopathologiques et tests biomécaniques.

Règle des 3R :

Remplacement Nous sommes fortement engagés dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur culture tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Réduction :

Le nombre de brebis utilisées dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (norme ISO 10993 – partie 6 : méthodes d'évaluation de la sécurité des dispositifs médicaux) et sur les contraintes scientifiques (étude de l'évaluation de la tolérance locale, de la biomécanique et de la fusion à 13, 26 et 52 semaines). Des examens de tomodensitométrie sont prévus à 4, 13, 26, 39 et 52 semaines après implantation.

Raffinement :

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés. Par ailleurs, les petits ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur hors période post-opératoire. Dans tous les cas, l'hébergement individuel est validé par la structure du bien-être animal et une dérogation aux conditions d'hébergement est renseignée dans la DAP.

14169 Le Myélome Multiple (MM) est une maladie hématologique (= maladie du sang) caractérisée par la prolifération incontrôlée d'un type de cellules sanguines de la famille des globules blancs : les plasmocytes (cellules sécrétant les anticorps). Le traitement actuel du MM repose sur la chimiothérapie et la greffe de moelle osseuse. Malgré de récents progrès thérapeutiques, cette maladie est encore aujourd'hui incurable et certains sous-groupes de patients qui répondent mal aux traitements conventionnels, présentent une survie relativement courte.

Notre projet vise à développer et à évaluer de nouveaux outils thérapeutiques utilisant l'activité du système immunitaire (immunothérapie) dans le traitement du MM afin d'améliorer la prise en charge des patients résistants aux traitements classiques. Ces nouvelles thérapies se sont montrées particulièrement efficace dans le traitement d'autres types de cancers (sein, prostate, leucémie). Le développement de traitements plus spécifiques et efficaces chez tous les malades laisse espérer une meilleure prise en charge des patients atteints du MM.

Dans le contexte du MM, nous avons construit des anticorps artificiels qui reconnaissent d'une part, les cellules tumorales, et, d'autre part, les cellules de l'immunité dotées d'une activité cytotoxique. L'activation des cellules immunitaires et leur rapprochement aux cellules tumorales favoriseraient leur reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses.

Pour mener à bien ce projet, nous allons mettre en place, dans un premier temps, un modèle murin développant un MM. Des souris dépourvues de système immunitaire, afin d'éviter tout rejet de greffe, vont recevoir par voie intraveineuse une injection d'une lignée tumorale de MM humain. Dans un second temps, ces souris recevront ou non, par voie intraveineuse, les anticorps artificiels à des doses optimales, préalablement définies (traitement répété pendant 5 jours). La croissance tumorale et l'efficacité des stratégies thérapeutiques utilisées seront suivies par imagerie *in vivo*, sur souris anesthésiées et sera réalisée une fois par semaine pendant toute la durée de l'étude (soit 8 acquisitions au maximum).

En accord avec la règle des 3R, nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* afin de valider l'efficacité de nos molécules thérapeutiques. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle *in vivo* intégrant la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrières limitant l'efficacité des traitements. Nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 555 souris, sur une durée de 5 ans.

Une attention toute particulière sera également portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Les souris présentant des souffrances, des douleurs et/ou des angoisses seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 2 mois, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

14170 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) représentent aujourd'hui un problème de santé publique majeur dont l'incidence ne cesse de croître dans les pays européens et nord-américains. Plusieurs facteurs aggravants ont été identifiés dont une altération du microbiote intestinal nommée dysbiose ou encore la présence de certaines bactéries pathogènes tel que *Escherichia coli* adhérente et invasive (AIEC). De manière intéressante, des bactéries bénéfiques

dont l'abondance diminuerait chez les patients atteints de MICI ont été identifiées. Cependant, l'immense complexité du microbiote intestinal complique les études visant à déterminer si ces bactéries bénéfiques seraient capables ou non d'inhiber la colonisation et la pathogénicité de bactéries pathogènes telles que les souches AIEC. Bien qu'à ce jour aucune thérapie curative n'ait été développée, une stratégie prometteuse serait la modulation du microbiote intestinal en favorisant les populations bactériennes bénéfiques afin de lutter contre les bactéries pathogènes intrinsèques.

C'est pourquoi, à l'aide d'une approche novatrice, ce projet vise à mieux caractériser les interactions entre l'hôte, le microbiote et les souches pathogènes AIEC impliquées dans ces pathologies inflammatoires chroniques intestinales. A plus long terme, ce travail permettra d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer la qualité de vie et le pronostic des patients atteints de MICI en ciblant spécifiquement le microbiote intestinal. L'approche envisagée repose sur l'utilisation d'un modèle murin possédant un microbiote intestinal simplifié, contrôlé et sain. Afin de mimer les conditions pathologiques, ces animaux seront soit 1) soumis à une inflammation intestinale chronique, soit 2) infectés par des bactéries pathogènes AIEC ou encore 3) colonisés par des souches potentiellement bénéfiques. Ces animaux ont déjà permis une meilleure compréhension des mécanismes d'infection et de résistance mettant en jeu des pathogènes humains et ne seront soumis à aucun prélèvement invasif.

Pour des raisons éthiques, cette étude ne peut se faire chez l'Homme et il n'existe, à ce jour, aucune méthode d'expérimentation *in vitro* alternative pour étudier les mécanismes mis en jeu dans les MICI.

Afin de minimiser au mieux le nombre d'animaux impliqués dans ce projet, le regroupement de ces trois procédures permettra une diminution du nombre d'animaux par groupe expérimental, une mutualisation maximale des échantillons, ainsi qu'une fiabilité optimale des résultats. De plus, afin d'optimiser l'utilisation de chaque animal, un maximum d'échantillon sera prélevé puis analysé. Enfin, le nombre total d'animaux nécessaire a été réduit dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet et est estimé à 180.

Ainsi, l'objectif 1) prévoit l'étude de l'impact de l'inflammation sur l'environnement intestinal impliqué dans les MICI grâce à l'utilisation de 30 animaux. L'objectif 2) vise à étudier le rôle de l'infection bactérienne sur le déclenchement et le maintien de la dysbiose intestinale et prévoit l'utilisation de 30 animaux. L'objectif 3) vise à l'identification de bactéries bénéfiques envers les MICI et prévoit l'utilisation de 120 animaux. Nombre d'animaux estimés à 180. Ce projet a été dessiné sur 5 ans.

Quel que soit le groupe expérimental, les animaux seront suivis au cours du temps, hébergés dans des cages enrichies et dont la litière sera changée de manière hebdomadaire. Une observation quotidienne sera réalisée et les animaux seront immédiatement sortis du protocole s'ils présentent deux des critères suivant : une perte de poids supérieure à 20% ; un dos voûté, un poil dru ou une démarche traduisant un mal-être ; du sang dans les fèces ou de la diarrhée.

14171 De par sa fréquence, le cancer colorectal représente un problème de santé publique majeur. De plus, de nombreuses études scientifiques réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré le rôle des plaquettes sanguines dans le cancer de manière générale. En effet, les plaquettes, de par leur capacité à s'agréger autour des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine, vont aider les cellules cancéreuses à survivre dans la circulation sanguine face aux agressions que représentent le système immunitaire et les forces de cisaillements. Les plaquettes, une fois agrégées autour des cellules cancéreuses, représentent également une surface idéale pour adhérer à la paroi des vaisseaux sanguins et réaliser le processus de métastases. Cependant la présence et le rôle des plaquettes dans le microenvironnement tumoral n'ont jamais été décrit. Nos résultats *in vitro* sur la prolifération cellulaire d'une lignée cellulaire de cancer colorectal ont démontré que les plaquettes pouvaient avoir un rôle anti tumoral. Afin de confirmer ce rôle anti-tumoral des plaquettes dans un modèle complexe faisant intervenir tous les éléments cellulaires et moléculaires du microenvironnement tumoral, nous souhaitons développer un modèle murin de cancer colorectal syngénique ectopique. Nous nous proposons donc d'étudier le rôle des plaquettes sur la croissance tumorale de par l'utilisation d'animaux dont la déplétion en plaquettes sera induite par injection sous

cutanée ou intraveineuse d'un cocktail d'anticorps spécifiquement utilisé dans ce but (Anticorps déplétant). Un groupe d'animaux contrôle recevra par la même voie d'administration un cocktail d'anticorps contrôle. Dans la littérature, ce cocktail d'anticorps déplétant est connu pour dépléter totalement les plaquettes une heure après son injection par voie intraveineuse et ce pendant quarante-huit heures. Dans un souci d'utilisation d'un nombre minimal d'animaux et de réduire la souffrance animale liée à des injections caudales répétées, un protocole pilote sera réalisé sur 4 animaux (2 dans chaque groupe) pour déterminer si l'injection sous cutanée de ce cocktail d'anticorps permet une déplétion plaquettaire satisfaisante (au moins 90% de déplétion). Les animaux utilisés au cours de ce protocole pilote nous permettront de déterminer quelle est la déplétion plaquettaire obtenue et évitera ainsi des prélèvements répétés sur les animaux utilisés au cours du protocole réel comptant 12 animaux (6 dans chaque groupe). Le nombre total d'animaux dans ce projet sera donc de 16. Dans le cas où l'injection sous cutanée de l'anticorps déplétant ne permette pas une déplétion plaquettaire satisfaisante, l'injection intraveineuse sera indispensable. Dans le but de respecter la règle des 3R, les souris seront hébergées par groupe de 5 avec comme enrichissement du coton pour nidification ou des dômes. La totalité des expérimentations sera effectuée par du personnel compétent sous anesthésie générale volatile pour les mesures du volume tumorale et les prélèvements sanguins. Les animaux seront observés quotidiennement, ainsi que la disponibilité à la nourriture et à l'eau de boisson. Le change complet des cages sera effectué une fois par semaine. Les souris seront hébergées dans une pièce avec une température et hygrométrie régulée et contrôlée, avec un rythme circadien respecté.

14172 Les patients diabétiques courent un risque élevé de complications, dont les plaies cutanées et notamment les plaies chroniques des membres inférieurs. Parmi ces plaies, les ulcères du pied diabétique (UPD), sont les plus courants et les plus graves. Environ 7 millions de personnes en Europe et aux États-Unis souffrent d'UPD, dont 50 % seraient infectées chaque année et 1 million seraient infectées par *Staphylococcus aureus*, l'agent pathogène le plus courant dans les UPD.

Le traitement aux antibiotiques n'est souvent pas efficace contre les bactéries multi-résistantes qui sont maintenant courantes : 85 % des amputations chez les patients diabétiques surviennent après échec du traitement. La composition microbienne des plaies joue un rôle important dans la cicatrisation. Le simple fait d'éradiquer autant de bactéries que possible, avec des antibiotiques conventionnels peu performants, et dans le contexte de la résistance aux antibiotiques, ne fonctionne pas. Il apparaît donc nécessaire de trouver des alternatives thérapeutiques.

Le produit que nous allons tester est une endolysine exclusive unique, qui tue spécifiquement *S. aureus* (y compris le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)) tout en préservant les bactéries bénéfiques. L'activité de ce produit pour le traitement des maladies de la peau associée à *S. aureus* est déjà démontrée *in vitro* et fera bientôt l'objet d'études réglementaires précliniques d'innocuité pour la dermatite atopique.

Ce produit est une alternative aux antibiotiques actuels, basée sur les mécanismes de fonctionnement des endolysines pour éradiquer les bactéries. Aucune résistance n'est attendue, et n'a été observée à ce jour, dans le cadre d'expériences spécifiques.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité *in vivo* d'une endolysine dans le modèle de plaie infectée à *Staphylococcus aureus* chez la souris diabétique.

Pour cela, 720 souris Swiss femelles vont être utilisées.

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

Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'une endolysine sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

Réduire : Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite. Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

Raffiner :

Avant l'expérimentation :

Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes, enrichies de frisstis. La litière est changée une fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

Détermination des points limites : figure 5, annexe 1.

Pendant l'expérimentation :

Soins pré et postopératoire : Les souris recevront une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,1mg/kg) 30minutes avant la lésion de la peau. Cette injection sera renouvelée 8h après puis 2 fois par jour sur les 2 jours suivants.

Evaluation des signes généraux : Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

Procédures : La lésion de la peau et l'infection de la lésion seront réalisées sous anesthésie générale.

Euthanasie : dislocation cervicale après pré anesthésie par inhalation d'isoflurane.

Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

14173 La fièvre de Lassa est une fièvre hémorragique virale aiguë d'une durée d'une à quatre semaines qui sévit en Afrique occidentale. Le virus de Lassa se transmet à l'Homme par contact avec des aliments ou des articles ménagers contaminés par l'urine ou les excréments de rongeurs. La transmission interhumaine et en laboratoire se produit également, en particulier dans les hôpitaux où les mesures de prévention et de lutte anti-infectieuse sont insuffisantes. La fièvre de Lassa est endémique au Bénin, au Ghana, en Guinée, au Libéria, au Mali, en Sierra Leone et au Nigéria, mais elle est sans doute présente aussi dans d'autres pays d'Afrique occidentale. Le taux global de létalité est de 1%. Celui des patients atteints de formes sévères peut atteindre 15% en milieu hospitalier. Des soins de soutien précoces, axés sur la réhydratation et le traitement symptomatique, améliorent les chances de survie. Actuellement, aucun vaccin ne protège contre la fièvre de Lassa.

Sur la base des connaissances actuelles de la pathogénèse du virus de Lassa (LASV) et des qualités qu'un vaccin efficace doit posséder (innocuité, stabilité, immunogénicité), 2 candidats vaccins différents ont été développés. Il a été démontré expérimentalement que ces 2 vecteurs peuvent induire une immunité protectrice contre LASV et plus largement contre d'autres arénavirus pathogènes. Dans une étude préliminaire sur macaques cynomolgus, il a été démontré que les deux candidats vaccins étaient immunogènes et capables de protéger les animaux d'une infection avec LASV.

L'objectif de ce nouveau projet est de déterminer l'immunogénicité d'un des deux candidats vaccins, ainsi que son efficacité contre l'infection avec différentes souches de LASV. De plus nous étudierons la durabilité dans le temps de l'effet protecteur du vaccin et nous déterminerons à partir de combien de temps après l'immunisation un effet protecteur peut être observé.

Le recours à l'animal et notamment aux primates non-humains ne peut être substitué car il n'existe pas de modèles *in vitro* ou rongeurs capables de reproduire la physiopathogénèse et les réponses immunitaires retrouvées chez l'Homme au cours de la fièvre de Lassa. Dans ce projet, 36 macaques Cynomolgus seront utilisés et répartis en 11 groupes pour tester le candidat vaccin en dose unique ou répétée. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, 3-4 animaux/groupe est un nombre satisfaisant pour être représentatif statistiquement (hors groupe contrôle, car données antérieures exploitables). Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale (+antalgique si nécessaire) pour éviter toute souffrance ou stress. Les animaux seront hébergés en groupe social et bénéficient d'un programme d'enrichissement adapté.

14174 Le syndrome de Netherton (SN) est une maladie génétique cutanée rare dont l'incidence est estimée à 1/200000. Il est caractérisé par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale (dermatose inflammatoire génétique), une anomalie capillaire et des manifestations atopiques (allergiques). Ces symptômes sont présents dès la naissance, entraînant des infections bactériennes, une déshydratation, une hypothermie et une perte de poids extrême et sont à l'origine d'un taux de mortalité postnatal élevé. Ces symptômes conduisent à une inflammation sévère de la peau évoluant par poussées ayant un fort impact sur la qualité de vie des personnes atteintes. Jusqu'à présent, il n'existe pas de traitement efficace pour les sujets atteints du SN.

Seule l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés et inductibles au tamoxifène ainsi qu'un modèle de xéno greffe humaine, mimant le plus fidèlement possible les symptômes du SN, permettra de développer et tester l'efficacité de nouvelles thérapies. Nous utiliserons ces modèles pour tester des molécules thérapeutiques ayant eu des résultats intéressants *in vitro* afin d'évaluer l'effet du blocage de certaines molécules cibles sur le phénotype du syndrome de Netherton. Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R, un nombre minimal d'animaux sera donc utilisé. Dans ce projet, un total de 854 animaux est estimé pour une durée de 5 ans. Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour obtenir des résultats analysables, en incluant les répétitions indispensables à la démonstration. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, une anesthésie sera pratiquée et les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. Les antalgiques seront administrés systématiquement en post-opératoire et pourront être administrés en cas de nécessité dans les autres procédures. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. A terme, les résultats précliniques de ce projet permettront de développer de nouvelles thérapies ayant le potentiel d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

14175 Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes impliqués, et comment les mutations sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie *in vivo*. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies, nous prévoyons d'utiliser 5 modèles murins pour les myopathies congénitales. L'utilisation de souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie *in vivo*. Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une /jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris / groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Un maximum de 7080 souris sera utilisé.

14176 Objectif du projet :

La maladie de Huntington (HD) est une maladie héréditaire et orpheline, qui se traduit par une dégénérescence neurologique provoquant des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques, et évoluant jusqu'à la perte d'autonomie puis la mort. Cette maladie neurodégénérative est d'origine génétique. Les chromosomes, support du patrimoine génétique, sont composés d'ADN et de protéines. Les gènes sont des fragments d'ADN. Chaque gène, lorsqu'il est connu et identifié, est localisé précisément sur un chromosome. La maladie de Huntington est due à une mutation d'un

gène qui porte l'information pour la fabrication d'une protéine, la huntingtine, dont la fonction normale est inconnue à ce jour, même si l'on sait qu'elle a un rôle protecteur sur le cerveau. La mutation responsable rend toxique la protéine huntingtine mutée.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier dans des modèles de souris transgéniques vigiles ou anesthésiés de la maladie de Huntington :

-les modifications des réseaux neuronaux liées au génotype par des enregistrements électrophysiologiques in-vivo.

-l'efficacité / toxicité de composés en développement sur les modifications des réseaux neuronaux. Pour ces études, des enregistrements électrophysiologiques permettront d'étudier les modifications du réseau neuronal induites par administration unique ou répétée de composés en développement par voie entérale (orale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire).

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 6060 souris (60 souris seront dédiées aux actions de formation et de maintien de compétences).

Avantages : Ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie *in vivo* permettra de mettre en évidence les modifications des réseaux neuronaux associés aux modèles de la maladie de Huntington et de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement sur les modifications du réseau neuronal. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones. Plusieurs paramètres électrophysiologiques peuvent être mesurés sur un même animal : l'activité neuronale, la plasticité synaptique et l'activité oscillatoire.

Domages escomptés : Les modèles de souris transgéniques que nous utiliserons présentent un phénotype dommageable à l'âge étudié mais ne nécessitent pas de conditions d'hébergement ou d'enrichissement spécifiques. En cas d'administration de composés, il se peut que des signes d'inconfort ou d'intolérance se manifestent. Pour les études sur animal vigile, suite au placement par chirurgie des électrodes, il se peut que les animaux présentent des signes de douleur malgré les précautions prises pendant la phase de chirurgie (analgésiques, anesthésiques) et en post-opératoire (antibiotiques). Dans tous les cas, des points limites préalablement définis et adaptés à l'espèce, aux conditions post-opératoires et aux modes d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) : L'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations seront réalisées chez la souris car il existe de nombreux modèles transgéniques associés à la maladie de Huntington, utilisés par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés. Ces souris, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

-réduction : le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique de base, activité neuronale). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3. 1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : à leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (nids végétaux, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant l'étape de chirurgie nécessaire au placement des électrodes, une période d'acclimatation des animaux d'au moins 5 jours sera respectée. Pendant la chirurgie, plusieurs mesures seront mises en place afin de réduire au maximum la douleur : utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, application de gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement de la cornée, maintien d'une température constante.

Pour les études sur animal vigile après l'étape de chirurgie, les animaux seront isolés afin d'éviter tout dommage au niveau des implants ou l'apport de germes susceptibles de provoquer une infection. Les animaux recevront une antibiothérapie adaptée. Un suivi renforcé des animaux sera réalisé après la phase d'opération.

Avant le début d'administration des composés, une période de récupération post-chirurgicale d'au moins une semaine sera respectée.

Dès la réception des animaux, une observation journalière sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés à chaque espèce et mode d'administration permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux (souffrance, stress, angoisse...) et ainsi de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

14177 L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de futures molécules dans le traitement de l'achondroplasie, une maladie affectant principalement les os longs et la plaque de croissance chez l'enfant. La maladie est due à une mutation d'un gène responsable de la synthèse du récepteur des facteurs de croissance. Dans le cartilage, ce récepteur a un rôle inhibiteur sur la croissance osseuse. Des recherches orientées sur ce gène sont donc une voie très prometteuse dans le traitement de cette maladie.

Avant de passer en phase clinique, des études précliniques ciblées sont nécessaires pour définir les doses thérapeutiques optimales. Ces études sont l'objet de la demande du présent projet.

Ce projet sera réalisé en respectant au mieux la règle des 3Rs.

Remplacement :

L'efficacité des molécules à tester a été déjà évaluée sur des modèles *in vitro* mais seul le traitement d'animaux atteints de cette mutation permettra de valider leur efficacité sur le tissu entier regroupant à la fois le cartilage et l'os.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ces modèles animaux. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes d'un minimum de 8-10 souriceaux par groupe seront analysés. Le nombre d'animaux a été défini afin de générer des résultats valides et de permettre une interprétation scientifique solide. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 90 souriceaux au maximum (ce nombre pourrait être réduit selon le nombre de petits par portée lors de la naissance): 45 souriceaux homozygotes possédant le génotype d'intérêt *Fgfr3^{ach/+}* et 45 souriceaux hétérozygotes ne possédant pas le génotype d'intérêt et utilisés comme contrôles.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souriceaux seront hébergés avec leurs mères dans un milieu enrichi adapté à leur âge et état physiologique. Les animaux seront observés et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Des points limites sont définis en fonction de l'âge et de l'expression de la mutation.

En conclusion, ces études réalisées chez la souris pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de l'achondroplasie chez l'enfant. Au total, cette étude nécessitera au maximum 450 souriceaux pour 5 molécules sur une durée de 5 ans.

14178 La variété de profils cliniques observée dans la maladie d'Alzheimer plaide en faveur d'une prise en charge personnalisée de la prévention, du diagnostic et du traitement de cette affection. Le sexe est un facteur critique à prendre en compte car les femmes ont un déclin cognitif plus marqué que les hommes à un stade précoce de la maladie d'Alzheimer. Des travaux suggèrent que les interactions entre certaines régions cérébrales, comme l'hippocampe et le cortex préfrontal sont plus affectées chez les femmes que chez les hommes lors de l'émergence d'une maladie d'Alzheimer. Dans le nouveau modèle des souris AppNL-F/MAPT double knock-in (dKI), car doublement humanisées pour les gènes de l'APP et de tau, les femelles peinent à reconnaître un objet au bout de 24h à un âge où les mâles n'ont pas ce problème. Or cette forme de mémoire dépend justement du dialogue hippocampe-cortex préfrontal qui s'instaure pendant les phases de sommeil. Une perturbation des cycles veille sommeil, comme celle observée chez le patient Alzheimer, pourrait contribuer aux déficits des femelles. Quelques mois plus tard, les deux sexes ont des difficultés à reconnaître une association objet-place qui dépend du dialogue cortex entorhinal latéral -hippocampe. Notre but est de vérifier que la connexion hippocampe-cortex préfrontal est effectivement perturbée chez les femelles mais pas chez les mâles au début de leur pathologie et que par la suite c'est la connexion cortex entorhinal latéral -hippocampe qui est affectée chez les deux sexes. Pour prouver dans chaque cas que c'est la perturbation de la connexion qui provoque le déficit, nous étudierons l'efficacité de cette connexion par une approche combinée d'optogénétique et d'électrophysiologie, puis nous tenterons de rétablir de bonnes performances de mémoire en stimulant la connexion quand les souris AppNL-F/MAPT effectuent la tâche. Enfin, les performances de reconnaissance seront évaluées sous un traitement qui vise spécifiquement la pathologie amyloïde et s'est montré efficace auparavant sur le rappel d'une association objet-place afin de déterminer si son efficacité est maintenue sur ce test chez les souris AppNL-F/MAPT et si elle est la même dans le test de reconnaissance d'objet chez les femelles. Nos travaux devraient donc contribuer à mieux comprendre l'origine des différences liées au sexe au début d'une pathologie Alzheimer et plaideront en faveur de la mise en place de diagnostic et/ou de traitement personnalisés en fonction du sexe.

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

Remplacer. L'étude des relations entre les troubles de la mémoire et les anomalies du fonctionnement neuronal induits par une pathologie Alzheimer nécessite l'utilisation de l'animal vivant. Les modèles *in vitro* ou computationnels ne permettent pas à ce jour de rendre compte de la complexité des fonctions de la mémoire : ils ne reproduisent pas les changements d'activité des neurones dans chaque région du cerveau impliquée dans la mémorisation d'un événement et ils ne peuvent pas reproduire la réponse comportementale permettant d'évaluer la performance dans un test. Réduire. Le nombre d'animaux est réduit au maximum de 12 à 15 par groupe selon le test comportemental pour assurer l'efficacité des tests statistiques. Certains tests de reconnaissance requièrent un minimum de 15 souris par groupe car ce sont des formes de mémoire extrêmement subtiles dont les déficits peuvent passer inaperçus chez l'homme si elles ne sont pas spécifiquement testées. Les caractérisations de l'activité locomotrice circadienne et de l'évolution à long terme de la neuropathologie en fonction de l'âge seront combinées en une expérience. L'ensemble du projet requiert 912 souris. Raffiner: Les souris bénéficieront d'éléments d'enrichissement dans leur cage (matériel de construction du nid, un tube refuge et des boulettes de nourriture à manipuler dans la cage), ainsi qu'un suivi quotidien de leur état général. Elles seront maintenues en groupe sociaux sauf pour la durée des tests de comportement. Tous les tests comportementaux sont basés sur le comportement d'exploration spontanée de la souris. Un suivi plus spécifique pour chaque procédure avec des points limites adaptés pour éviter toute souffrance.

14179 L'utilisation d'implants dentaires insérés dans l'os alvéolaire permet de remplacer les racines dentaires absentes et de fixer des prothèses dentaires aux patients édentés. Cette méthode est aujourd'hui validée par la communauté scientifique. La principale limite technique actuelle à la mise en place d'implants dentaires est un volume osseux insuffisant et il est alors nécessaire de procéder à des greffes osseuses. La résorption osseuse des maxillaires est un phénomène naturel lié à divers facteurs locaux ou généraux. Il est possible de limiter cette résorption osseuse grâce au

comblement des alvéoles dentaires au moment de l'extraction de la dent, à l'aide d'os autogène ou de biomatériaux. L'os autogène est le plus efficace, mais son prélèvement peut entraîner des complications locales et il n'est disponible qu'en quantité limitée. Des biomatériaux naturels ou synthétiques peuvent également être utilisés. Les biomatériaux disponibles permettent de guider la formation osseuse (ostéo-conduction) mais ils n'induisent pas la régénération osseuse (ostéo-induction). Les matériaux sous forme de poudre ou de granules sont souvent difficiles à manipuler, aboutissant à un comblement parfois incomplet ou excessif. Le développement d'un matériau injectable possédant des propriétés d'ostéo-conduction et d'ostéo-induction ainsi qu'une manipulation aisée est l'objectif général de ce projet. Nous avons montré dans des études préalables qu'un biomatériau composite (polymère - phosphate de calcium) sous forme de blocs était ostéo-conducteur et ostéo-inducteur chez le petit et le gros animal. Ce matériau a été rendu injectable et les résultats sur le petit animal (rat) ont montré qu'une régénération osseuse complète apparaissait à son contact. Des études préliminaires sur la brebis ont montré une néoformation osseuse importante dans le modèle d'élévation du plancher sinusien (sinus lift) avec un volume osseux équivalent voire supérieur à un matériau de référence. Afin d'améliorer encore ce matériau injectable composite, nous avons modifié sa composition en augmentant la quantité de charges minérales en son sein afin d'améliorer encore la néoformation osseuse. Il est maintenant nécessaire d'évaluer que la mise en place d'implants dentaires en titane (modèles commerciaux) est possible dans le volume osseux néoformé et que ces implants s'intègrent de façon équivalente dans l'os résultant du comblement réalisé avec le matériau test et de celui réalisé avec le matériau contrôle. Il existe actuellement deux modalités pour la mise en place des implants dentaires après comblement sous-sinusien : soit les implants sont mis dans le même temps opératoire, soit ils sont placés après cicatrisation de la greffe osseuse (6 mois après la première intervention le plus souvent). Deux brebis seront utilisées pour cette expérimentation. Le modèle chirurgical qui sera réalisé est celui du comblement du plancher du sinus maxillaire (Sinus Lift) avec mise en place simultanée ou différée des implants dentaires. Dans le groupe « mis en place simultanée », les implants seront placés dans le même temps opératoire que le comblement osseux et un temps de cicatrisation de 6 mois sera observé avant euthanasie et prélèvement des échantillons. Dans le groupe « mise en place différée », les implants seront placés lors d'une seconde intervention, 6 mois après l'intervention de comblement osseux. Une période de cicatrisation de 3 mois sera observée après mise en place des implants, puis les échantillons seront prélevés. Nous pourrions évaluer 2 échantillons par modalité d'implantation) après le sacrifice des animaux et le recueil des échantillons. La brebis est le meilleur modèle pour l'étude de la régénération osseuse pré-implantaire du sinus maxillaire. Il est indispensable de réaliser cette expérimentation avant de passer à des essais cliniques chez l'homme afin de valider l'efficacité de ce matériau dans cette indication. Le nombre d'animaux a été calculé afin d'obtenir des données suffisantes permettant de conclure sur l'efficacité de cette procédure. Les expérimentations seront conduites dans un établissement spécialisé, habitué à la gestion de ce type d'animaux et de chirurgies et possédant une structure du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires qui travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin. L'analgésie post-opératoire et le suivi des animaux seront effectués par des vétérinaires spécialisés. Les points limites ont été définis dans le protocole.

14180 La sumoylation est une modification des protéines par un petit peptide, appelé SUMO, qui permet de moduler leurs fonctions dans la cellule. Ainsi, la sumoylation touche de nombreux aspects de la vie d'une cellule, et des travaux récents ont montré son importance dans des pathologies humaines à forte prévalence, telle que la maladie d'Alzheimer ou le cancer, maladies dont la complexité requiert le recours à des modèles animaux.

Le laboratoire a développé plusieurs modèles murins permettant d'abolir totalement ou partiellement la sumoylation. Cependant, ces modèles entraînent respectivement soit une létalité précoce soit aucun phénotype en absence de stress.

Ce projet vise à mettre au point un modèle chimique de perte de la sumoylation transitoire et modulable dans des modèles murins. Cela serait réalisable grâce à une molécule récemment

développée par une société privée, et actuellement en essai clinique chez l'homme comme traitement anti-cancéreux.

Il s'agit donc ici d'une étude pilote visant à établir le protocole le plus adapté et efficace possible et à observer ses effets potentiels sur le long terme.

Ces travaux mettant en jeu plusieurs types cellulaires et phénomènes différents nécessitent une étude sur l'organisme entier, ce qui impose le recours à des animaux. Le but de cette procédure est de mettre au point un modèle d'hyposumoylation transitoire dans le modèle murin. Un modèle cellulaire *in vitro* existe déjà au laboratoire.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 600 souris mâles et femelles âgées de 6 à 12 semaines, sur 5 ans repartis en deux procédures, une légère (240 souris) et une modérée (360 souris). Ce nombre pourra être réduit au vu des premiers résultats obtenus. Le test statistique utilisé sera le test type ANOVA ; un modèle à effet mixte.

Ce nombre est le nombre de souris nécessaire pour définir 2 procédures de perte de sumoylation non-délétère. La deuxième procédure n'aura lieu que si la première nous permet d'induire une perte de la sumoylation sans effets secondaires liés à la molécule.

Les cages contiennent des copeaux et sont enrichies avec du coton permettant aux souris de recréer des « espaces /niches » comme dans les conditions de leur habitat ancestral. Les procédures pouvant engendrer des souffrances pour les animaux, ceux-ci seront surveillés et mis à mort dès qu'ils atteignent un des points limites définis grâce à une grille de suivi de la douleur.

Le bénéfice attendu de cette étude pilote est de développer un modèle chimique de perte de la sumoylation transitoire et modulable dans des modèles murins. Cela permettra à l'avenir d'utiliser cette molécule dans les différents projets du laboratoire explorant le rôle de la sumoylation.

14181 L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de la fibrose du foie et de la stéatose hépatique non alcoolique.

L'apparition d'une fibrose dans le foie (fibrose hépatique) est une complication principale de toutes les maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, parasitaire, biliaire ou autre. La fibrose hépatique se caractérise par un dysfonctionnement des hépatocytes mesurable par une augmentation permanente des taux circulants des enzymes hépatiques, de la bilirubine, et par une altération importante de la production de protéines majeures comme l'albumine et la prothrombine, indispensable à la coagulation. En l'absence de traitement efficace à l'heure actuelle, la fibrose peut évoluer vers une forme plus grave et non réversible, la cirrhose, qui est une cause importante de morbidité et de mortalité chez l'homme. La greffe de foie reste la seule solution envisageable pour le patient à ce stade de la maladie.

La stéatose hépatique non alcoolique ou stéatohépatite métabolique (aussi appelée NASH pour Non Alcoholic Steato Hepatitis) est une pathologie aussi caractérisée par des anomalies du bilan hépatique avec augmentation du taux de transaminases dans le sang. Son diagnostic repose essentiellement sur l'analyse histologique d'une biopsie hépatique qui montre une augmentation des lipides stockés dans les cellules hépatiques accompagnée d'une inflammation, et d'une fibrose plus ou moins marquée en fonction de l'avancement de la maladie. Elle survient chez un patient qui n'a pas d'autre maladie hépatique d'origine virale, auto-immune, génétique ou toxique, et surtout qui n'a pas une maladie alcoolique du foie. Les facteurs de risque pour le développement de la stéatohépatite non-alcoolique sont entre autres la résistance à l'insuline, le surpoids et l'adiposité viscérale. La stéatohépatite métabolique, chez environ un tiers des patients, évolue à travers différents degrés de fibrose vers une cirrhose et favorise l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire (CHC).

Etant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans ces deux pathologies, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats *in vitro*. Il s'avère donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui récapitule les différents aspects de la pathologie humaine, afin de pouvoir évaluer *in vivo* les meilleurs composés identifiés.

Les animaux utilisés dans ce projet seront des rongeurs (souris et rats) car la fibrose hépatique dans ces deux espèces est considérée comme suffisamment prédictive de l'efficacité de composés chez l'homme. La majorité des animaux utilisés dans ce projet seront exposés régulièrement à des injections répétées d'un produit chimique déclenchant une inflammation dans le foie, avec pour conséquence l'apparition d'une fibrose en quelques semaines. Dans le cas de la stéatohépatite métabolique, un régime alimentaire riche en lipides et en sucre sera proposé aux animaux, afin de créer un environnement métabolique favorable à l'accumulation de lipides dans le foie. Afin de récapituler les différentes étapes de la pathologie hépatique humaine, un modèle permettant le développement de tumeurs hépatiques sur un fond de stéatohépatite métabolique va être mis en place. Les signes cliniques attendus sont modérés avec une perte de poids transitoire consécutive à chaque exposition à l'agent chimique. Une observation quotidienne des animaux est réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et un avis vétérinaire est demandé en cas de doute. En cas de signes cliniques de souffrance au-delà de ceux attendus, des points limites sont mis en œuvre.

Une analyse bio-statistique des données générées dans le modèle de fibrose a déjà été réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de 50% de la fibrose dans le foie. Pour le modèle de tumorigenèse, des études pilotes nous permettront de déterminer le nombre d'animaux à inclure dans ce type d'expérience.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 700 souris et de 300 rats par an, soit 5000 animaux sur la totalité des 5 ans du projet.

14182 Les troubles olfactifs sont fréquents dans la maladie de Parkinson. Ces troubles de l'odorat pourraient être la conséquence de facteurs environnementaux agissant dans la cavité nasale. Notre nez est colonisé par plusieurs milliards de microbes constituant le microbiote nasal, essentiel à notre santé. Les troubles précoces de l'odorat dans la maladie de Parkinson pourraient être les conséquences d'une dysbiose nasale, c'est-à-dire d'un déséquilibre de la diversité du microbiote nasal. Ensuite, on pourrait imaginer que des dysfonctions affectent successivement le système olfactif et le cerveau pour finalement causer les troubles moteurs. Notre projet vise à identifier la présence d'une dysbiose nasale dans la maladie de Parkinson. Nous analyserons le microbiote de plusieurs centaines de patients avec maladie de Parkinson et testerons le lien causal entre la dysbiose et les déficits olfactifs. L'opportunité d'étudier deux populations ayant une exposition environnementale très différente, en France métropolitaine et aux Antilles, devrait permettre d'identifier des anomalies du microbiote spécifiques à la maladie de Parkinson. Pour élucider le rôle de la dysbiose nasale dans la maladie de Parkinson, nous tenterons de générer des nouveaux modèles murins expérimentaux, par inoculation nasale de microbiote de patients parkinsoniens. Une implantation du microbiote nasal de patients parkinsoniens et de contrôles sera effectuée chez la souris de laboratoire par instillation intranasale, sous anesthésie légère gazeuse, pour étudier le phénotype après colonisation. Seront étudiés les répercussions de la composition bactérienne des échantillons cliniques sur la santé des animaux colonisés, notamment l'impact sur leur système nerveux, leur activité locomotrice, leurs capacités motrices, olfactives et mnésiques. Nos travaux visent à identifier de nouvelles thérapies ciblant le microbiote nasal pour combattre cette maladie.

Ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire car des cultures cellulaires ne peuvent pas rendre compte de la complexité de la propagation de l'inflammation et de la pathologie dans le temps et dans les structures cérébrales, ainsi que des conséquences sur la motricité, la perception sensorielle et la mémoire. Nous respecterons la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) en limitant à 864 souris adultes des deux sexes (50 % femelle ; 50 % mâles) sur 5 ans le nombre d'animaux statistiquement utiles pour mener à bien ce projet. Ce projet comporte une seule procédure appliquée aux souris. Le degré de sévérité de cette procédure est modéré, en raison des troubles sensoriels, cognitifs et moteurs qui pourraient résulter de l'administration intranasale de microbiote d'origine humaine (patients parkinsoniens et sujets sains). Les animaux seront surveillés quotidiennement après cette inoculation. Afin de limiter les dommages pour les animaux, nous utiliserons systématiquement une anesthésie et une analgésie chaque fois que cela est indiqué. Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé et surveillées strictement de façon à garantir leur bien-être.

14183 L'alimentation des poissons représente un poste clé dans la réussite des systèmes d'élevages aquacoles. Ces aliments sont formulés pour répondre aux exigences des poissons (nutrition, appétence) afin d'assurer la croissance et la santé de ceux-ci.

Les poissons carnivores utilisent les acides aminés d'origine alimentaire comme source d'énergie, justifiant ainsi un apport protéique important dans les rations alimentaires. Les hydrolysats protéiques contiennent des acides aminés libres et petits peptides en grandes quantités qui présentent une digestibilité presque parfaite. Cette biodisponibilité élevée associée à des activités biologiques antioxydantes et immunostimulantes pourraient permettre aux poissons d'acquérir une résistance élevée face aux stress de manipulation susceptibles d'être rencontrés en conditions d'élevage.

C'est l'hypothèse que nous allons tenter de confirmer par les expériences décrites ci-dessous.

Les bénéfices physiologiques des hydrolysats chez les poissons sont obligatoirement conditionnés par leur assimilation préalable, c'est pourquoi une étape de conditionnement alimentaire est nécessaire. Nous testerons 8 traitements alimentaires en triplicats (24 bassins). Ces aliments sont tous formulés pour répondre aux besoins nutritionnels des poissons

Ces aliments seront complétés avec différents hydrolysats protéiques. Ce conditionnement alimentaire, pendant lequel nous récupérerons des indicateurs de performances zootechniques (croissance, indice de conversion), est d'environ 8 semaines en fonction de la taille des poissons et de l'objectif zootechnique ciblé. La distribution des granulés se fait via un distributeur automatique (Arvotec) qui étale l'alimentation de 8h à 15h tous les jours, les rations sont ajustées pour que les poissons soient nourris Ad libitum.

Les 8 aliments expérimentaux consistent en 2 aliments dits témoins : le témoin positif, contenant 20% de farines de poissons (représentant la référence du marché). Le témoin négatif contenant 5% de farines de poissons (représentant l'objectif du marché).

Tous les aliments testés sont formulés, et fabriqués, pour répondre aux besoins nutritionnels de l'espèce étudiée. Les 6 autres aliments expérimentaux correspondent à l'aliment témoin contenant 5% de farine de poissons, supplémentés d'hydrolysats protéiques (3 à 8%), supposés fonctionnels.

Pour résumer le plan expérimental :

1. Aliment A = témoin négatif 5% farine de poisson
2. Aliment B = témoin positif 20% farine de poisson
3. Aliment basal A + hydrolysat 1
4. Aliment basal A + hydrolysat 2
5. Aliment basal A + hydrolysat 3
6. Aliment basal A + hydrolysat 4
7. Aliment basal A + hydrolysat 5
8. Aliment basal A + hydrolysat 6

Cette étude vise à analyser la réponse endocrine (hormonale) du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) suite à un stress aigu de confinement (procédure 2) et confirmer si elle peut être modulée par une alimentation fonctionnelle, contenant des hydrolysats protéiques. Cette réponse endocrine sera évaluée en dosant les concentrations de cortisol (hormone du stress) dans le plasma de poissons prélevés à différents temps (T0 i. e. niveau de cortisol avant induction du stress, T30mn et T120mn) et après euthanasie par un surdosage d'anesthésiant Phenoxy-ethanol (1 ml/l) en balnéation).

Parmi les 960 poissons concernés par la phase de conditionnement alimentaire de chaque étude, 216 seront marqués par transpondeur de verre type radio-frequency-identification (procédure n°1), puis 144 d'entre eux réaliseront le test de stress de confinement (procédure n°2). Il est programmé, au maximum une étude par an, pendant 5 ans. Le nombre maximum de poissons concernés par les procédures expérimentales sera donc de 1080 poissons ($216 \times 5 = 1080$).

Le principe des 3R est respecté:

-Remplacer : il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous cherchons à vérifier si la réponse physiologique des poissons au stress de manipulation peut être modulée, et réduite, par la nutrition.

-Réduire : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre des analyses statistiques fiables, et robustes, malgré la variabilité individuelle de la réponse hormonale. L'utilisation d'individus juvéniles (pas mature sexuellement) contribue à réduire encore ce nombre en écartant la prise en compte d'un effet sexe. Alors que 960 poissons sont concernés par la phase de conditionnement alimentaire pour chaque étude, seuls 216 seront marqués (procédure n°1), parmi lesquels 144 poissons réaliseront le test de stress (procédure n°2).

-Raffiner : les conditions d'élevage sont optimales pour l'espèce. C'est-à-dire des densités faibles (<10kg de biomasse par m³ d'eau), un taux de renouvellement de l'eau important (250%/heure) et des aliments répondant à l'ensemble des besoins nutritionnels des poissons.

Toutes les manipulations sont pensées expressément pour réduire au maximum le stress des animaux. De cette façon nous garantissons le bien-être des animaux. L'expérimentation et les prélèvements seront réalisés par du personnel qualifié, et habilité à expérimenter, en respectant les règles d'hygiène, de sécurité et d'éthique. Le stress et la douleur des individus sont limités à leur minimum par : la mise à mort des individus par sédation profonde avant prélèvement de sang.

14184 Le purpura thrombotique thrombocytopénique acquis (PTT-a) est une maladie rare et grave, touchant le plus souvent l'adulte jeune. Les manifestations de cette pathologie sont une baisse du nombre de plaquettes, une baisse de l'hémoglobine et une souffrance brutale d'un ou plusieurs organes comme le rein et le cerveau. Sans prise en charge adaptée, 90% des patients décèdent.

Le PTT-a est lié à la formation de caillots de plaquettes dans les petits vaisseaux de l'organisme, les plaquettes s'agrégeant sur des grandes protéines : les multimères de von Willebrand (VWF-HM), ces multimères étant dégradées par l'enzyme ADAMTS13 en situation physiologique. Deux évènements sont nécessaires pour déclencher la maladie : premièrement le système immunitaire des patients inactive l'enzyme ADAMTS13, qui ne peut alors plus dégrader les multimères de von Willebrand ; et deuxièmement l'activation des cellules endothéliales qui vont libérer brutalement de grandes quantités de VWF-HM.

Dans le cadre d'un projet thérapeutique sur un modèle murin de PTT, nous importons des souris génétiquement modifiées déficiente en ADAMTS13 (souris knock out ADAMTS13) telles qu'elles ont été développées aux USA. Ces souris ont un phénotype dommageable, elles ont en effet une tendance à avoir des plaquettes basses et une survie spontanée légèrement diminuée. Il n'y a pas d'effet de ce phénotype dommageable sur la fertilité ni sur la prolificité.

Le plan d'élevage nous a été donné par le laboratoire fournissant les animaux : 1 mâle sera hébergé avec 1 femelle, l'index de prolificité moyen est de 7 souris, avec un rapport mâle – femelle à la naissance de 1 :1.

Afin de respecter les règles éthiques, nous serons attentifs à appliquer la règle des 3R (« réduire, raffiner, remplacer »). Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum, et a été déterminé grâce à une feuille de calcul fournie en annexe. Le nombre de souris nécessaire pour l'élevage a été estimé à 120 souris, et le nombre de souris nécessaire pour l'entretien de la lignée a été estimé à 20 souris par an soit 60 souris. Les animaux seront visualisés quotidiennement, et une attention particulière sera accordée aux procédures de raffinement. Les souris disposeront de Les animaux disposent de nestlets, nid végétal à base de fibres courtes de coton, utilisé comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de réduire l'ennui et de diminuer le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité à l'animal.

14185 Notre équipe s'intéresse à la dynamique des cellules, comment elles bougent, interagissent avec leurs voisines et leur environnement direct. Pour cela, nous utilisons des cellules extraites à partir d'embryons précoces de poulet ou de *Xenopus laevis* (la présente demande). Nos travaux portent sur trois aspects de la dynamique cellulaire: 1/ comment une population de cellules acquiert la capacité de se déplacer (effecteurs moléculaires: gènes, protéines), 2/ comment le déplacement

est régulé par des signaux externes (environnement, autres cellules), 3/ comment les cellules s'arrêtent de migrer.

Nous utilisons diverses stratégies expérimentales mêlant biologie moléculaire et cellulaire, imagerie, biologie quantitative et modélisation. L'embryon de Xénope est un modèle classique de biologie du développement. De par sa grande taille, il est notamment particulièrement adapté aux stratégies de microinjection et de microdissection. Nos recherches fondamentales visent à étudier les mécanismes impliqués dans le développement embryonnaire précoce avant la mise en place du système nerveux central et de fait, se réalisent sur des embryons âgés de 2 jours.

Nous travaillons dans le cadre de la logique des 3R:

Remplacer: Toutes les expérimentations qui ne nécessitent pas l'utilisation du Xénope sont systématiquement effectuées sur des modèles alternatifs comme l'embryon de poulet aux stades précoces (4 premiers jours d'incubation sur 21 au total) ou une lignée de cellules de crêtes neurales de souris (O9-1).

Réduire: Nous portons une attention particulière à la réduction du nombre de Xénopes hébergés au laboratoire ainsi que des embryons utilisés pour l'expérimentation et veillons donc à faire évoluer nos techniques expérimentales en conséquence. Ainsi, nous prévoyons d'utiliser 80 femelles et 200 mâles pour ce projet soit 280 animaux. Les femelles sont conservés à des fins purement reproductives. Chaque femelle est amenée à pondre une fois tous les 3 à 4 mois. Les mâles sont euthanasiés avant biopsie des gonades au fil des besoins. Ceci explique le décalage entre le nombre de femelles et celui des mâles. Afin d'utiliser un minimum de mâles, ceux-ci sont stimulés hormonalement pour assurer leur fertilité avant euthanasie. Cette stimulation permet de réduire la variabilité et réduire de moitié le nombre de mâles utilisés.

Raffiner: Nous nous appliquons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des Xénopes au maximum et veillons au bien-être de nos animaux en suivant quotidiennement les signes visibles d'un animal souffrant et en procédant si nécessaire à une euthanasie. Les animaux bénéficient d'un nouveau système d'hébergement dans une pièce plus calme, les bacs sont teintés pour réduire l'exposition aux changements d'environnement (ex: entrée d'une personne). De plus, nous avons réduit le nombre d'animaux par bac afin de réduire le stress. Enfin, nous avons standardisé les procédures d'injection des femelles ce qui nous permet d'utiliser une quantité minimale d'hormone.

14186 La schizophrénie (SZ) est l'une des maladies mentales les plus invalidantes et dévastatrices aux enjeux socio-économiques importants. En effet, le taux de développement de nouveaux médicaments innovants est faible et de nombreux symptômes restent encore insensibles aux traitements, particulièrement parce que l'étiologie de la maladie reste mal connue. Parmi les différentes hypothèses, celle de la double atteinte suggère qu'un facteur génétique ou environnemental précoce (première atteinte) rend le système nerveux central plus vulnérable à un facteur environnemental subséquent, tardif (deuxième atteinte), provoquant ainsi l'apparition d'une symptomatologie schizophrénique hétérogène qui émerge principalement durant l'adolescence ou chez le jeune adulte. Ainsi, deux facteurs interagissent ensemble à des temps différents pour favoriser le développement des symptômes schizophréniques. Des études épidémiologiques, couplées à des études chez l'animal indiquent que des déficits en acide gras oméga-3 (normalement contenu dans une alimentation équilibrée) ont un impact négatif sur le bon développement cérébral du fœtus et de l'enfant. De plus, ces acides gras sont également impliqués dans le développement de certains systèmes de neurotransmission comme celui impliquant la Dopamine qui est tout particulièrement impliquée dans la schizophrénie. Notre hypothèse est que cette carence précoce en oméga-3 interfère avec la signalisation cérébrale, favorisant la vulnérabilité à la psychose particulièrement lorsqu'elle est associée à d'autres facteurs de vulnérabilité (génétique, épigénétiques, environnementaux, ...). Le métabolisme des acides gras insaturés est complexe et mêle une synthèse lipidique endogène et l'apport exogène d'acides gras dont certains ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme (acides gras essentiels). Par ailleurs, les oméga-6 ont des effets opposés aux oméga-3. Pour reproduire au mieux les différentes alimentations possibles chez l'humain et voir les effets spécifiques des oméga-3, nous avons besoin de 3 types d'alimentation : carencée en oméga-3 et enrichie en oméga-6 ; carencée en oméga-3 et

enrichie en oméga-9 ; riche en oméga-3 (acide linoléique + acide docosahexaénoïque + acide eicosapentaénoïque). Nous utiliserons un modèle animal de rats avec nos 3 alimentations dès la période in utero, qui se poursuivra après la naissance. Les approches comportementales et lipidomiques associées à une carence en oméga-3 proposées dans ce projet ne sont possibles qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peuvent être reproduites ni *in vitro* ni *ex vivo*. La règle des 3R s'applique ici pour les principes de réduction et de raffinement. Nous faisons le protocole alimentaire à la demande de notre client. Le nombre d'animaux est calculé selon son protocole expérimental. Dans cette étude, 36 femelles rats gestantes seront soumises aux 3 types de régime cités précédemment (12 femelles gestantes par régime) dès le premier jour de gestation (suite à l'accouplement sur une nuit) jusqu'à l'expédition des petits (avec la mère ou non selon l'âge d'expédition demandé) chez notre client. Une portée de rat peut compter jusqu'à 15 petits. Donc, nous estimons que le nombre de petits à naître peut-être de 540. Ainsi, pour ce projet, nous estimons que 576 rats seront utilisés. Les femelles gestantes seront hébergées en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (bâton de bois à ronger et matériel de nidification). Puis, avant les mises-bas, les femelles seront individualisées pour être seules avec leur portée dans une cage contenant de l'enrichissement à ronger et du matériel de nidification. Les points limites seront observés tout au long du projet. Une surveillance des animaux sera réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

14187 La lamproie de Planer est une des trois espèces de lamproies européennes, toutes protégées au titre de la directive habitat faune-flore. Elle vit dans de petits cours d'eau, où elle se déplace pour gagner ses sites de reproduction. Ces petits cours d'eau sont parfois fragmentés par des seuils (prise d'eau pour microcentrales électriques ou moulins) qui ne perturbent pas forcément la migration d'espèces emblématiques comme le saumon, et ne sont donc qu'exceptionnellement aménagés pour le franchissement par les poissons. Mesurer l'impact de ces obstacles sur les déplacements des lamproies de Planer constitue un fort enjeu de conservation. Ceci peut être fait grâce à un protocole de capture-marquage-recapture, où des individus capturés en aval de l'obstacle sont marqués (typiquement avec un transpondeur), puis la proportion d'individus recapturés à l'amont de l'obstacle indique sa franchissabilité. Cependant, ce type d'étude n'est représentatif que si la pose de transpondeur n'affecte pas la physiologie (survie, condition) ni la mobilité des poissons. Une première expérience a été réalisée sur le comportement des lamproies après implantation d'un PIT tag. Les résultats ont notamment montré la nécessité de travailler sur les soins post-marquage.

Le projet soumis ici a pour objectif de tester l'effet de l'implantation d'un transpondeur cylindrique (PIT tag) de 12 mm de long et 2 mm de diamètre dans la cavité générale sur la physiologie des lamproies de Planer adultes (12 à 17 cm de long, 15 mm de diamètre). Pour ce faire, 110 lamproies de Planer adultes seront prélevées par pêche à l'électricité dans le milieu naturel (têtes de bassin versant), et 90 d'entre elles (choisies parmi les 110 de sorte à homogénéiser les tailles corporelles et retirer les individus de moins de 12 cm ; les 20 lamproies restantes seront conservées dans un canal séparé) seront réparties en trois lots de 30 individus : le premier lot sera marqué par PIT tag sans soin post-implantation, le second lot sera également marqué par PIT tag et un traitement sera appliqué pour favoriser la cicatrisation, le troisième lot ne sera pas marqué (lot témoin). Les 3 lots seront répartis équitablement dans 3 canaux rectangulaires de 2.40m de long, 60 cm de large et 15 cm de profondeur. Chaque canal comptera ainsi 10 individus par traitement (30 individus au total). Les lamproies seront maintenues pendant deux mois dans les canaux, dans lesquels un courant d'eau sera généré (recirculation) et la température sera contrôlée. Le marquage se fera sous anesthésie par balnéation, en utilisant des instruments stériles. Le remplacement par un modèle de simulation ou par une autre espèce n'est pas envisageable ici, car il n'existe pas d'élevage pour la lamproie de planer, et les autres espèces voisines sont de plus grande taille (règle des 3 R : Remplacement). L'effectif de 30 individus par traitement est le minimum nécessaire pour atteindre une puissance statistique suffisante (Règle des 3R : Réduction). Enfin, les conditions d'hébergement des lamproies seront adaptées de manière à ressembler au maximum à leurs

conditions de vie naturelles (règle des 3R : Raffinement) : une surface de 1.4 m² pour 30 individus, ce qui correspond à une densité observable dans la nature pour cette espèce grégaire ; un substrat graveleux comme sur les sites de reproduction ; un constant flux d'eau (préalablement ozonée), avec un renouvellement partiel hebdomadaire, une photopériode naturelle, dans des conditions ombragées (sous abri).

Les adultes de cette espèce ne s'alimentent pas. Les points limites sont définis sur la base d'observations du comportement de nage et de la couleur des lamproies, permettant de réagir rapidement à des signes d'inconfort exprimés par les animaux. A 30 et 60 jours, les individus seront récupérés puis anesthésiés pour mesurer leur taille et de poids. En fin d'expérience, après 60 jours, 10 individus par traitement seront mis à mort pour déterminer l'emplacement du PIT tag dans les viscères et comparer l'état des organes internes des animaux avec et sans PIT tag et avec et sans soin post-marquage. Les individus restants seront ensuite conservés pendant 3 mois environ dans les mêmes installations jusqu'à leur reproduction puis leur mort naturelle, qui est systématique après la reproduction.

14188 Les tumeurs cérébrales appelées glioblastome étant de très mauvais pronostic, des recherches très intenses sont indispensables pour améliorer leur prise en charge thérapeutique. La croissance et la réponse aux traitements de ces tumeurs mettent en jeu des mécanismes de communication très complexes, bi-directionnels, entre les cellules tumorales elles-mêmes et leur microenvironnement cérébral. Cette complexité ne peut pas être modélisée à l'aide de cultures cellulaires *in vitro* et la mise en œuvre de modèles *in vivo*, tels que les modèles de greffes intracérébrales de tumeurs humaines chez la souris, sont nécessaires pour valider au niveau préclinique les stratégies thérapeutiques envisagées (Remplacement). La difficulté posée par l'utilisation des modèles de tumeurs intracérébrales *in vivo* reste le suivi de la croissance tumorale au cours du temps.

L'objectif du projet est de développer, à partir de cellules de glioblastome exprimant la luciférase (lignée U87-luc2) et capable d'émettre un signal bioluminescent, un modèle de tumeur greffée en intracérébral chez la souris, et de caractériser la croissance tumorale grâce à une technique d'imagerie non invasive et quantitative, la bioluminescence (BLI), dont le signal sera détecté et mesuré à l'aide d'un système original nommé OptiMAX®. Les techniques d'imagerie non-invasives permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation puisqu'elles permettent de réaliser des suivis dans le temps sur un même animal (Réduction). Pour valider le modèle d'une part, et les mesures de BLI d'autre part, nous serons amenés à (i) comparer la croissance de tumeurs U87-luc2 à celle de cellules U87 conventionnelles, et ce, après greffe sous-cutanée ou après implantation intracérébrale ; (ii) confronter les résultats d'imagerie BLI obtenus avec le système Optimax aux approches standard (c'est-à-dire : pour les tumeurs sous-cutanées, les mesures au pied à coulisse ; pour les tumeurs intracérébrales, l'imagerie IRM) classiquement utilisées pour la détermination des volumes tumoraux.

Ainsi, au maximum 62 souris immunodéficientes recevront une greffe sous-cutanée ou intracérébrale de cellules cancéreuses U87-luc2 ou U87 selon des protocoles maîtrisés par le laboratoire. Le développement des tumeurs implantées sera suivi au cours du temps par pied à coulisse pour toutes les tumeurs sous-cutanée, par IRM pour toutes les tumeurs intracérébrales et en parallèle, par BLI pour toutes les tumeurs U87-luc2. Tout au long de l'étude qui n'excèdera pas 10 semaines, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie, etc), et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

14189 L'irradiation cérébrale garde une place importante dans le traitement de nombreuses situations pathologiques en cancérologie. Elle peut cependant induire des complications neurologiques sévères et invalidantes qui sont irréversibles. Il n'existe à ce jour aucun traitement préventif ni curatif. La cascade des événements responsable de cette complication n'est pas clairement établie, notamment les étapes précoces qui vont induire les troubles cognitifs tardifs. Ce qui est habituellement retrouvée est un dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) avec

une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins qui pourrait être à l'origine d'une cascade de réactions inflammatoires conduisant à la destruction tardive du tissu nerveux. Les capillaires sanguins sont constitués de cellules endothéliales qui composent le tube et de péricytes juxtaposés qui entourent les capillaires sanguins pour les stabiliser. Des études récentes montrent que les péricytes sont un rôle essentiel dans la régulation de la BHE et dans le contrôle du flux sanguin en réponse à la demande tissulaire. Par ailleurs, nous avons montré que le ciblage de ces derniers par la thalidomide permettait de stabiliser les capillaires sanguins et réduire les hémorragies chez les patients atteints de la Maladie de Rendu-Osler. L'objectif de ce projet est de déterminer si le ciblage des péricytes par la thalidomide permet prévenir les complications neurologiques induites par l'irradiation cérébrale. Le développement des complications radio-induites au niveau cérébral implique des interactions cellulaires complexes, entre les cellules endothéliales et les péricytes mais également entre les capillaires sanguins et le tissu neuronal – neurones et astrocytes – et les cellules immunitaires. Cette complexité est difficile à reproduire *in vitro* et nécessite donc l'utilisation d'animaux notamment dans notre cas des souris génétiquement modifiées qui permettront de visualiser les péricytes, les cellules endothéliales, les astrocytes ou/et neurones en temps réel (souris exprimant un rapporteur fluorescent spécifiquement dans un type cellulaire). Pour mesurer comment l'irradiation cérébrale affecte les fonctions des péricytes, différentes approches technologiques seront utilisées et couplées. Des tests comportementaux vont être effectués 1 mois après irradiation. Les cerveaux vont être ensuite analysés par immunohistochimie afin d'observer les éventuels changements de morphologie ou de densité des cellules endothéliales, péricyte, neurone, oligodendrocyte, cellules gliales et cellules immunitaires. Le nombre de souris utilisées (48) dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est requis pour obtenir des résultats scientifiques et statistiques valides. Notamment, il est indispensable de reproduire les résultats de façon indépendante, d'avoir plusieurs échantillons, et des animaux génétiquement identiques afin de minimiser les variations. Les tests statistiques utilisés consistent à comparer un paramètre variable entre plusieurs groupes : test statistique One way ANOVA. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soin et les méthodes utilisées sont en ligne avec les recommandations afin de réduire au maximum souffrance, douleur, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux. Pour toute expérimentation invasive, des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés, selon les recommandations établies.

14190 La douleur chronique, définie par la Haute Autorité de Santé comme « une douleur persistante et récurrente, qui dure au-delà de ce qui est habituel pour la cause initiale, accompagnée d'une détérioration significative et progressive des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient dans ses activités de la vie journalière », se décline en plusieurs sous-types. Parmi ces sous-types, nous nous intéressons plus particulièrement aux douleurs par excès de nociception, telles que les douleurs neuropathiques, qui sont liées à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel. Certains antidépresseurs, anticonvulsivants et opioïdes représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles, mais ces traitements ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux. Le mécanisme conduisant à la douleur neuropathique, ainsi que les mécanismes d'action des traitements actuels ne sont que partiellement connus, mais les données précliniques déjà existantes ouvrent des pistes pour de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Comment tester le potentiel thérapeutique de ces nouvelles molécules sur la douleur neuropathique ? Cet effort préclinique nécessite des modèles reproduisant la condition pathologique ainsi que sa réponse aux traitements existants et un paramètre simple permettant d'identifier facilement l'action thérapeutique et se prêtant à un criblage pour la nouvelle cible thérapeutique. Pour cela, nous souhaitons tester l'efficacité d'un petit ARN interférent (siRNA) sur l'allodynie mécanique et la douleur spontanée, les symptômes principaux de la douleur neuropathique.

Le projet nécessitera 312 animaux et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures.

Remplacer : Au vu de notre thématique d'étude, il nous est impossible de remplacer notre modèle *in vivo* par un modèle *in vitro* ou *in silico*. La caractérisation de la douleur et de sa composante

émotionnelle et affective nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire : les expériences seront cependant réalisées avec la volonté de réduire au minimum le nombre d'animaux par condition expérimentale tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Pour cela la taille des groupes expérimentaux a été préalablement calculé grâce à une power analyse. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés certaines des procédures expérimentales feront partie d'un enchaînement et utiliseront les mêmes animaux, ce qui en réduira grandement l'effectif. Pour cette raison une même cohorte d'animaux sera étudiée et caractérisée au niveau comportemental et émotionnel, puis fera l'objet d'investigations cellulaires.

Raffiner : Les animaux sont hébergés en animalerie dont la température, l'humidité et le cycle jour/nuit sont contrôlés, nourriture et boisson sont disponibles ad libitum. Ils seront hébergés en cohorte de 4 à 5 individus pour respecter leurs besoins sociaux. Des carrés de coton seront placés dans la cage pour favoriser la nidation, et des barreaux de bois à ronger pour limiter les comportements d'agressivité. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie pré-, per- et post-opératoire. La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté tout au long de la procédure. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche d'évaluation objectivée permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale.

14191 Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des composés d'origine naturelle (hormones et phyto-œstrogènes) ou provenant des activités humaines (produits issus de l'industrie chimique contenus dans des objets de consommation courante, pesticides, cosmétiques ...) capables d'interférer avec la fonction du système endocrinien et de ce fait, entraîner des effets néfastes sur la santé. Les sources d'exposition sont multiples (air, sols, eaux, produits de consommation) et leurs effets sur la santé humaine et animale sont encore mal connus. Les PE peuvent perturber le fonctionnement hormonal par divers mécanismes d'action et ainsi altérer les effets biologiques des hormones sur des grandes fonctions corporelles telles que le développement, la reproduction et le métabolisme. Chez les espèces saisonnières, la reproduction et le métabolisme énergétique sont des fonctions finement régulées par les hormones thyroïdiennes dans le système nerveux central. Les variations annuelles de ces hormones au niveau de l'hypothalamus contrôlent la synthèse de protéines impliquées dans la reproduction et le métabolisme, permettant ainsi de synchroniser le statut reproducteur et métabolique des individus avec les saisons. Ces régulations complexes permettent de synchroniser la naissance des progénitures aux périodes les plus favorables de l'année. Cependant, les effets biologiques des hormones thyroïdiennes sont particulièrement sensibles à l'action des PE. Un nombre croissant d'études rapportent qu'une multitude de PE interfèrent à tous les niveaux de l'homéostasie thyroïdienne : régulation centrale, synthèse, transport, distribution tissulaire, métabolisme et dégradation des hormones thyroïdiennes. Les effets de telles altérations du système thyroïdien sont encore peu connus, mais nous posons l'hypothèse que l'exposition d'espèces saisonnières à des PE pourrait altérer la régulation annuelle de leurs fonctions biologiques par les hormones thyroïdiennes.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de deux PE couramment trouvés dans l'environnement : le Bisphénol A (BPA) et le DiéthylHéxyl Phtalate (DEHP) sur les fonctions reproductrices et métaboliques du hamster sibérien, une espèce saisonnière bien établie.

Pour ce faire, des hamsters sibériens mâles et femelles seront exposés à de faibles doses environnementales de PE, par incorporation dans l'alimentation, en période prénatale ou à l'âge adulte. Le but sera d'évaluer les effets directs ou transgénérationnels des PE sur l'adaptation saisonnière (soit activation lors du transfert de jours courts en jours longs ; soit inhibition lors du transfert de jours longs en jours courts) du statut reproducteur et métabolique des hamsters sibériens.

Pour réaliser ce projet nous avons besoin de 768 hamsters sibériens.

Remplacement : L'expérience doit être réalisée sur l'animal entier. Les mécanismes saisonniers et les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens font intervenir des voies de signalisation multiples dans différents types cellulaires, tissus et organes, nous empêchant donc de travailler sur un modèle *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux est établi au minimum requis de $n = 10$ par sexe, pour chaque dose de PE.

Raffinement : En conditions de laboratoire, les hamsters sibériens sont des animaux sociaux, ils seront donc maintenus par groupe de 4, en cages collectives enrichies avec un bâtonnet de bois et du matériel de nidation (coton).

Ce projet nécessitera la pose sous-cutanée de puces électroniques afin d'identifier les animaux maintenus en cages collectives. Cette procédure sera réalisée sous anesthésie gazeuse. La température corporelle sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. Les animaux seront suivis 5 jours suivant l'injection (mesures du poids corporel, observations du site de l'injection). Afin d'éviter des procédures invasives et stressantes pour les animaux, les PE seront administrés par incorporation à leur nourriture habituelle.

Afin de limiter la souffrance induite à l'animal, des points limites ont été définis permettant à tout moment d'exclure l'animal de l'étude. Ainsi le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience.

14192 La réponse immunitaire anti-infectieuse consiste à amener, au bon moment et au bon endroit, les cellules capables de répondre à une agression afin de limiter celle-ci. Une étude dynamique de la réponse immunitaire, grâce notamment à la microscopie intra-vitale sur l'animal vivant permettra de mieux en comprendre l'organisation spatio-temporelle et d'identifier les acteurs de la réponse immunitaire face à diverses agressions. La microscopie intra-vitale consiste à observer pendant quelques heures, suite à une légère chirurgie, et un laser dont la toxicité est indétectable, les cellules dans leur environnement, alors que l'animal est sous anesthésie. La souris est un modèle de choix car son système immunitaire partage de nombreux éléments structurels et fonctionnels avec celui de l'homme.

Notre approche se compose de quatre procédures distinctes :

1) Initialement, nous identifierons par prélèvement sanguin nos souris (âgées de 3 à 6 semaines) déficientes ou non pour certains gènes principalement impliqués dans les voies signalétiques de la réponse immunitaire. Seules les souris qui ne seraient pas génétiquement modifiées seront mises à mort. Il s'agira d'une procédure légère.

2) Lors de la 2ème procédure, nous étudierons ces souris déficientes pour ces gènes mentionnés ci-dessus et nous inoculerons différents microorganismes invasifs ou des agonistes provoquant des processus inflammatoires aigus. L'étude de la réponse immunitaire induite par ces agents dans les souris déficientes nous permettra de cibler les gènes et les cellules importantes pour la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate. Cette procédure sera d'une sévérité modérée.

3) Après inoculation de l'un ou l'autre agent, nous ferons ensuite des cinétiques permettant de déterminer la fenêtre temporelle pour une réponse immunitaire optimale grâce à la cytométrie en flux. Cette procédure sera d'une sévérité modérée.

4) Enfin nous visualiserons la réponse immunitaire sur l'animal vivant par microscopie intra-vitale bi-photonique. Cette procédure sera d'une sévérité modérée pour l'étape de microscopie.

Afin de respecter la règle des 3R, de nombreuses expériences seront validées au préalable *in vitro* sur des lignées cellulaires afin de remplacer les animaux. Néanmoins, les animaux nous sont indispensables pour répondre à nos questions car ils permettent de visualiser plusieurs types cellulaires simultanément mais surtout de suivre une cinétique physiologique. Disséquer précisément les diverses étapes de la mise en place de la réponse immunitaire permettra d'obtenir des informations essentielles pour les premières phases de développement de thérapies qui pourraient plus tard être utilisées chez l'humain.

Il est important de souligner que les expériences d'imagerie permettent d'obtenir de multiples données pendant chaque acquisition et permettent de respecter au mieux la règle des 3R. L'anesthésie et l'administration d'analgésiques seront utilisés de façon adéquate afin de réduire au maximum la douleur des animaux. Le nombre de souris nécessaires pour obtenir des données statistiquement significatives est donc optimisé. Enfin, une puissance statistique pourra être faite une fois que des résultats préliminaires auront été obtenus afin d'ajuster possiblement à la baisse le nombre d'animaux utilisés. Toutes ces démarches permettront de réduire au maximum le nombre des souris utilisées tout en respectant un nombre suffisant pour nos données expérimentales et ainsi utiliser des méthodes d'analyse statistique comme le test 2-way Anova. Le nombre estimé de souris auxquelles nous aurons recours et qui seront mises à mort, pendant la période de 5ans, est de 4750 souris, un nombre qui devrait se traduire par l'obtention de résultats solidement étayés.

Les protocoles seront définis standardisés et optimisés afin de minimiser la souffrance animale en adoptant des procédures éthiquement approuvées. Nous surveillerons des points limites d'expérimentation (état général de l'animal (ex. prostration), aspect général du pelage) et utiliserons des antalgiques et des anesthésiques afin que l'animal ne soit pas inconfortable ou en souffrance. La litière pourra être modifiée afin qu'elle soit plus confortable pour l'animal et une alimentation gélatineuse pourra être mise à disposition à même la cage afin d'aider l'animal à s'hydrater et s'alimenter.

14193 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, concomitantes d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est actuellement le seul modèle permettant d'étudier le système immunitaire et reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Différents modèles animaux ont été décrits pour étudier ce syndrome dont la dynamique reste encore complexe. Un modèle murin est particulièrement décrit pour reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes biologiques observés chez l'Homme, décrits ci-dessus. Il s'agit du modèle CLP (Caecal Ligation and Puncture), basé sur la ligature et la perforation du cæcum sans obstruer l'intestin des animaux. Ce modèle combine la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien mimant fidèlement les ruptures d'appendice et les diverticulites perforées rencontrées chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire et la phase d'immunodépression.

De précédents travaux ont montré que le modèle murin CLP induisait des paramètres caractéristiques de l'immunodépression du système immunitaire adaptatif et inné tels que ceux observés chez le patient septique. Les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative ont des rôles différents, mais complémentaires, dans l'instauration de la réponse immunitaire. En effet, à la suite d'une infection, la réponse innée représente la première ligne de défense de l'organisme et précède donc la réponse adaptative. Restaurer le système immunitaire inné et adaptatif représente donc un intérêt médical majeur chez le patient septique immunodéprimé.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de produits thérapeutiques à restaurer la réponse immunitaire innée et adaptative de l'animal immunodéprimé à la suite d'un épisode septique.

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ceci permettrait aux patients de restaurer leur système immunitaire et ainsi prévenir les infections secondaires pouvant leur être fatales.

Règle des 3R: Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant l'immunodépression à la suite d'un sepsis n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats en tenant compte des études précédentes. Des groupes de souris témoins serviront de contrôle de chirurgie et le système immunitaire des souris septiques sera comparé à celui de ces souris contrôles non-septiques et à des souris septiques traitées par les candidats.

Un suivi d'éléments physiologiques et comportementaux des animaux aura lieu deux fois par jour jusqu'au 7^e jour puis une fois par jour jusqu'à la fin de la procédure afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis et affinés grâce aux études précédentes (ex : température corporelle). Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. L'intérieur des cages sera réchauffé grâce à une armoire chauffante ou à l'aide de matelas chauffants placés en dessous des cages jusqu'au moins 3 jours après chirurgie. Des aliments secs, humidifiés et de l'eau gélifiée seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 435 maximum. Cependant, dès qu'une expérience permettra d'obtenir les résultats escomptés dans chacune des procédures, le projet prendra fin, afin de ne pas utiliser l'intégralité des animaux.

14194 Ce projet a pour objectif de comprendre les effets du réchauffement et de l'acidification des océans sur des populations de poissons.

Les activités anthropiques sont à l'origine d'une augmentation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère. Une partie de ce CO₂ d'origine anthropique est absorbée par les océans, conduisant à une diminution du pH des eaux marines. Cette acidification des océans, combinée aux effets du réchauffement climatique, est de nature à menacer les espèces marines. Compte tenu de leurs capacités de régulation acide-base et hydrominérale, les poissons semblent relativement protégés contre des effets de l'acidification et du réchauffement des océans. Un doute subsiste cependant quant aux capacités homéostatiques des jeunes stades, embryon et larves, chez qui ces capacités ne sont pas encore totalement développées.

Dans ce contexte, une étude a été mise en place dans le but d'analyser la capacité d'adaptation à l'acidification des océans des jeunes stades de vie d'une espèce de poisson tempéré, le bar européen (*Dicentrarchus labrax*). La première partie des travaux envisagés a été réalisée dans le cadre d'une saisine précédemment validé par le comité (Fitness phase 1). Nous nous étions alors plus particulièrement intéressés aux réponses adaptatives proximales, c'est-à-dire physiologiques et comportementales, des premiers stades du cycle de vie. C'est la seconde partie de cette étude qui est l'objet de la présente saisine (Fitness phase 2). L'objectif de cette seconde phase de l'étude est de répéter les expérimentations précédentes sur une seconde génération de poisson dans le but de mettre en évidence d'éventuels effets trans-générationnels. Au cours de l'étude proposée, 3 niveaux de pression partielle de CO₂ (PCO₂ ; 400, 800 et 1 200 μ atm), correspondant à des valeurs de pH de 8.1, 7.8 et 7.6, seront croisés avec 2 niveaux de températures (15 et 20°C), chacun des 6 traitements étant traité en triplica. Ces conditions expérimentales ont été choisies sur la base des prévisions du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) pour 2100.

Comme pour la phase précédente, Fitness phase 2 sera réalisé dans le respect de la règle des 3R c'est à dire :

- que les procédures envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Réduction (utilisation d'un nombre d'animaux correspondant au minimum requis pour s'assurer de la robustesse de nos analyses statistiques)
- que les procédures envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Raffinement (tout sera mis en œuvre pour limiter l'angoisse et la souffrance des animaux).

- que l'économie du modèle animal ne peut pas être faite (Remplacer) dans la mesure où les processus étudiés concernent l'organisme vivant, dans son intégrité et en prenant en compte toute sa complexité.

Fitness phase 2 comportera trois étapes.

Etape 1 : production des larves.

Les animaux nécessaires à ce projet seront obtenus à partir d'un lot de géniteurs produit durant la phase 1 du projet et élevés toute leur vie à trois conditions de PCO₂ (400, 800, 1 200 μ atm ; pH 8.0, 7.8, 7.6) et à température ambiante. Ce lot de géniteurs est composé de 32 individus par condition soit 11 femelles et 21 mâles. Les œufs produits seront placés dans des incubateurs aux mêmes pH que leurs géniteurs. Le nombre total de larves qui seront ainsi produites pour la phase 2 est estimé à 54 000.

Etape 2 : évaluation physiologique des larves.

Les 54 000 larves obtenues au cours de la phase 1 seront réparties entre les 6 conditions expérimentales (trois réplicas par condition). L'évaluation physiologique des larves sera basée sur des mesures de croissance, de respirométrie (taux métabolique), de capacité de nage et d'activités spontanée. Des analyses d'échantillons tissulaires seront également réalisées (génétique, biochimie, enzymes digestives, développement musculaire et squelettique). Il faut noter que le nombre de réplicas proposé ici est déterminé par les lignes directrices des pratiques scientifiques imposées par les journaux scientifiques. Il nous est donc nécessaire de nous y conformer afin de pouvoir ensuite être en mesure de valoriser nos résultats sous forme de publications.

Etape 3 : évaluation physiologique de juvéniles.

La croissance des animaux sera suivie à l'aide de pesées et de mesures de longueur. L'évaluation physiologique des juvéniles sera basée sur des mesures de respirométrie (taux métabolique) et des tests de nage. Des analyses d'échantillons tissulaires et sanguins seront également réalisées afin d'obtenir des informations sur l'activité mitochondriale, la performance de la régulation acide-base et du transport de l'oxygène.

La littérature scientifique montre que quel que soit le trait étudié, les poissons sont caractérisés par une forte variabilité inter-individuelle (approx 400%). Parvenir à différencier des populations expérimentales dans ces conditions implique l'utilisation d'un grand nombre de poissons afin de déterminer le plus précisément possible la forme de la distribution du trait considéré au sein de ces populations. Le nombre de poissons impliqués dans le présent projet a été déterminé sur cette base, afin que nous disposions de la puissance statistique nécessaire pour assurer une représentation la plus fidèle possible de la variété des réponses possibles au sein des populations étudiées.

14195 L'hibernation est une adaptation physiologique et comportementale qui permet la survie de l'espèce pendant les périodes saisonnières défavorables (température extérieure basse et pénurie des ressources alimentaires). Tout au long de l'hibernation, afin d'économiser de l'énergie, l'animal va alterner entre des phases d'hypothermie corporelle profonde, appelées torpeurs, et des phases de réveil avec un retour à la normothermie (température corporelle normale régulée autour de 37°C chez les Mammifères et qui est très consommatrice d'énergie). Des travaux récents suggèrent que cette adaptation physiologique de l'animal impliquerait des modifications saisonnières de la fonction enzymatique des tanycytes, cellules tapissant la paroi du 3ème ventricule du cerveau. Ces tanycytes sont connus pour réguler la physiologie saisonnière en modifiant le statut thyroïdien local de l'hypothalamus. L'objectif de ce projet est donc de déterminer si les modifications de la fonction enzymatique des tanycytes peuvent contribuer au mécanisme de régulation du cycle torpeur/éveil. Pour ce faire, nous utiliserons le hamster syrien qui est une espèce hibernante bien établie. Des hamsters syriens mâles seront équipés de dispositifs permettant de suivre leur température corporelle (T_c) tout au long de l'expérience et ainsi d'identifier les phases de torpeur et de réveil durant l'hibernation.

Les animaux seront élevés en cycle lumière/obscurité de type photopériode longue à 22°C (PL22, mimant l'été), et seront transférés en photopériode courte (PC) à une température ambiante (T_a)

de 22°C (PC22, permettant de voir le rôle relatif de la photopériode et de la température) ou de 8°C (PC8, mimant l'hiver).

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

Pour réaliser ce projet, nous avons besoin au total de 162 hamsters syriens mâles distribués en 3 groupes : 18 animaux en PL22, 36 en PC22 et 108 en PC8, pour une durée maximale du projet de 5 ans. Ces 3 groupes sont subdivisés en sous-groupes de 9 animaux chacun.

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

Réduction : Sur la base des connaissances acquises sur le modèle animal et sur les techniques utilisées, le nombre d'animaux nécessaire à l'étude a été établi au minimum requis (n = 9/sous-groupe) pour obtenir des résultats statistiquement significatifs en utilisant des tests statistiques paramétriques et/ou non paramétriques. Raffinement : le hamster syrien est un animal social, durant la stabulation per se, les animaux seront donc regroupés par cohortes de 3 animaux par cage. Après chirurgie, les animaux seront placés en cages individuelles pour une meilleure récupération post-opératoire et pour assurer l'alternance des épisodes torpeur/éveil en PC qui serait très compromise en cages collectives. Dans tous les cas, les cages sont enrichies avec un bâtonnet de bois à ronger et avec du coton (22°C) ou de la frisure (8°C) pour faire un nid (à chaque association Température-Hygrométrie est associé le meilleur moyen de nidation). Le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience. Les procédures invasives envisagées seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie, pendant laquelle la température corporelle sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté relié à une sonde rectale placée dans l'animal. Les animaux seront suivis pendant la semaine suivant la procédure. Afin de limiter la souffrance induite à l'animal, des points limites ont été définis permettant à tout moment d'exclure l'animal de l'étude (voir l'arbre décisionnel binaire en annexe I).

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

14196 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

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

La perspective de ce projet est d'évaluer et de comparer, dans différents modèles murins, différents virus oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques. Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine. Cette évaluation se fera dans des souris qui seront préalablement pré immunisées ou non.

Cette étude permettra de savoir si la pré immunisation est capable d'inhiber entièrement ou partiellement l'activité thérapeutique du virus oncolytique testé.

Les résultats de cette étude permettront ainsi de déterminer si l'efficacité anti-cancéreuse sera limitée chez des patients pré-immunisés (préalablement en contact avec le virus) et si l'efficacité d'injections répétées de virus sera limitée par le système immunitaire.

De plus, sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de la chimiothérapie standard ou de l'immunothérapie afin de potentialiser l'activité antitumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins, préalablement pré immunisés ou non, les

combinaisons de ces virus avec des agents de chimiothérapies standards ou d'immunothérapie utilisés en clinique humaine pour le traitement de cancers de différentes origines.

Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques en association avec des substances antitumorales couramment utilisées en chimiothérapie anti-cancéreuse et permettront d'adapter les traitements aux patients.

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

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

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

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

Un nombre maximal de 7200 souris est envisagé pour ce projet.

-Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce, tel que du matériel de nidification. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, avec eau et nourriture ad libitum. La réalisation par des techniciens rompus à ses manipulations garantit la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux.

Des doses non toxiques de virus et de substances à activité antitumorales seront injectées, ces doses seront définies à la suite de recherches bibliographiques sur leur utilisation chez la souris.

Les procédures expérimentales seront arrêtées le plus précocement possible sur la base de points limites permettant de réduire le stress et la souffrance de l'animal. Pour toute technique le nécessitant, une analgésie et / ou une anesthésie est prévue dans ce projet.

14197 L'aldostérone (hormone minéralocorticoïde) est connue pour réguler la balance hydro-sodée dans le rein. Son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde (RM) est un récepteur nucléaire qui régule l'expression de gènes spécifiques.

En plus de l'épithélium rénal et intestinal, le RM est exprimé dans de nombreuses cellules non épithéliales telles que celles du cœur (cardiomyocytes), des vaisseaux (cellules endothéliales et musculaires lisses), du tissu adipeux (adipocyte, cellules inflammatoires), de la rétine (épithélium rétinien pigmenté, vaisseaux, cônes), des cellules inflammatoires (macrophages, cellules dendritiques) et du rein (cellules mésangiales et podocytes). L'administration chronique d'aldostérone associée à une surcharge en sel induit une fibrose du cœur (interstitielle et périvasculaire), des vaisseaux, du rein (glomérulosclérose et fibrose interstitielle) ainsi que des anomalies rétiniennes (remodelage et oedème), ainsi que des anomalies de la fonction de ces organes.

Il est donc désormais bien établi qu'une activation inappropriée du RM s'accompagne de dommages structurels tissulaires. Les données recueillies chez l'Homme et l'animal montrent que l'inflammation (infiltration de monocytes et macrophages, augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires) joue un rôle critique dans le remodelage induit par l'aldostérone. L'activation du RM par l'aldostérone favorise l'inflammation de plusieurs façons, notamment en stimulant la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui activent les facteurs de transcription pro-inflammatoires. La modulation des immunités innée et adaptative par le RM dans les organes affectés (rein, cœur, œil, tissu adipeux...) peut également jouer un rôle critique dans l'instauration et/ou le maintien du remodelage rénal, cardiovasculaire, adipeux et rétiniens.

Notre hypothèse est que l'inflammation induite par l'activation du RM, joue un rôle central dans les comorbidités cardiométaboliques et rénales présentes dans le syndrome métabolique et l'hypertension artérielle mais aussi leur impact sur la rétine. L'objectif du projet est de comprendre l'impact de la suractivation du RM sur les pathologies induites dans le coeur, les vaisseaux, le rein, la rétine, le tissu adipeux en utilisant 1) un modèle de rat avec sur expression du RM, selon son profil d'expression naturel (rat transgénique avec une construction déjà utilisée chez la souris par Le menuet et al.), 2) un modèle murin permettant la surexpression conditionnelle du RM dans les différents types cellulaires d'intérêt, en condition basale et lors de challenges alimentaires (régime riche en graisse, régime riche en sel) ou pathologiques avec induction d'une insuffisance rénale chronique ou de lésions rétinienne.

D'après notre expérience et en se basant sur la littérature ainsi que sur le résultat d'un logiciel de calcul du nombre d'animaux nécessaire en (G-Power), nous aurons besoin de groupes de 7 rats ou 10 souris transgéniques ou contrôles par condition afin de limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier les différences statistiques entre les résultats. Un total de 630 rat et 2120 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans et impliquer deux équipes de recherche.

Nos modèles de rat et de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact de la suractivation du RM sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier comme le foie par exemple.

Mise en oeuvre pratique des 3R :

- Réduction

Sous certaines conditions, nous pourrions utiliser les résultats des groupes contrôles obtenus au cours de séries expérimentales précédentes, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Cette substitution ne sera possible que si, par exemple, l'âge des animaux est le même et si les conditions d'hébergement des animaux sont les mêmes.

De plus, nos modèles de souris intéressent plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes. Donc les organes sur lesquels ne nous travaillons pas pourront être récoltés par d'autres équipes afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement

Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude. Les mesures de raffinement incluent une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie pré et post-opératoire lors de l'induction de l'IR chez les animaux, les protocoles thérapeutiques que nous allons utiliser sont maîtrisés et utilisés régulièrement dans notre équipe. Les points limites ainsi que les critères d'interruption d'expérimentation sont pré-définis et un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

- Remplacement

Nos modèles animaux sont utilisés pour étudier des mécanismes physiologiques visibles uniquement à l'échelle de l'animal. Toutes les études plus spécifiques sur des mécanismes plus délimités seront effectuées avec des cultures cellulaires.

14198 La pathogénèse de la dermatite atopique (DA) est complexe et reste à ce jour mal comprise. Plusieurs évidences cliniques suggèrent aujourd'hui que l'évolution du microbiote cutané au cours de la pathologie jouerait également un rôle important dans les récurrences, la chronicité et la sévérité de cette maladie. Il a été montré que la peau d'individus normaux est colonisée par une communauté microbienne très diverse, alors que les patients atteints de dermatite atopique présentent un déséquilibre avec une sur-représentation de souche de staphylocoques, notamment de *S. aureus*.

Les objectifs de cette étude seront dans un premier temps de développer un modèle murin de DA induit par l'application topique de souches de *Staphylococcus aureus*/ *Staphylococcus epidermidis* isolés de la peau de patients DA sévères ou modérés (ainsi que chez des individus porteurs sains),

dans un deuxième temps de mieux comprendre les mécanismes immunologiques associés et enfin de tester l'efficacité de molécules afin de bloquer l'inflammation cutanée induite par ces staphylocoques.

Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le mieux adapté pour le développement de modèles immunologiques. Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 680 souris au maximum. Le protocole est planifié de telle sorte que plusieurs analyses sont réalisées sur le même animal, et en fonction des résultats obtenus, certaines expériences ne seront peut-être pas réalisées. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte : les animaux seront endormis par anesthésie générale lors des procédures afin de diminuer au maximum le stress et la douleur de ces derniers. De plus, les procédures mises en place ne devraient pas donner lieu à des troubles des fonctions corporelles ou de l'état général des animaux, toutefois les animaux sont surveillés 3 jours par semaine et tout animal qui présenterait des signes physiologiques anormaux (souris prostrées, poils hérissés ou encore apparition de nécrose cutanée) suite à l'application épicutanée des composés, serait mis à mort.

De plus, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu. L'étude conduite dans ce projet ne peut être conduite qu'*in vivo* et fait suite à un package d'études *in vitro* qui ont illustré l'activité anti-inflammatoire de ces composés (remplacement).

14199 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Actuellement, les taux de guérison restent très faibles pour certaines formes de cancer et notamment les gliomes diffus de la ligne médiane (ou DMG). Ces tumeurs qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Les épendymomes (EPN) qui représentent 7% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont des tumeurs chimiorésistantes et dans plus de la moitié des cas les patients récidivent. La compréhension des processus pathogéniques particuliers de ces tumeurs demeure un challenge afin d'identifier des cibles appropriées pour de futurs développements thérapeutiques.

Compte tenu de la rareté de modèles *in vivo* de ces deux types tumoraux, le développement de nouveaux modèles de xénogreffes stéréotaxiques (xénogreffe dans le site originel du matériel tumoral chez le patient) est décisif pour atteindre ces objectifs. Pour cela, nous injecterons des cellules tumorales issues de biopsie fraîches de tumeurs de patients dans des souris adultes immunodéficientes (Nude). Dans ce contexte et afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents types tumoraux, nous grefferons la totalité des tumeurs qui seront mises à notre disposition, soit environ 40 tumeurs différentes par an. Il est donc prévu au total un maximum de 4 600 souris durant les 5 ans du projet, dans le cas où toutes les tumeurs reçues permettent de dériver un modèle *in vivo*.

Afin de remplacer et réduire au maximum l'utilisation d'animaux, le développement de modèles *in vitro* à partir des mêmes biopsies de patient seront réalisés en parallèle. Néanmoins, ces modèles alternatifs ne nous permettent pas encore de pouvoir appréhender le comportement tumoral dans son propre environnement mais également la réponse au traitement dans un organisme entier. En effet, il existe de manière très importante des interactions intercellulaires ainsi que la présence d'une barrière physiologique au niveau des vaisseaux sanguins dans le cerveau (BHE) qui limite le passage de médicaments. De plus, à ce jour dans le monde, aucun modèle *in vitro* d'EPN n'a pu être développé. Pour limiter la douleur engendrée par le développement de la tumeur, les animaux recevront un antalgique adapté en fonction de leur état clinique. Les souris seront hébergées par groupe et leur milieu sera enrichi afin de leur apporter un maximum de confort. Des points limites précoces et adaptés seront strictement respectés.

14200 Le cancer de la peau de type non-mélanome est la forme de cancer la plus répandue dans le monde et particulièrement chez les populations adultes à peau claire. Le développement de nouvelles stratégies pour lutter contre l'apparition de ce type de cancer reste un enjeu sociétal mondial, le nombre de cas détectés par an étant en constante augmentation. Parmi les facteurs de risques majeurs impliqués dans le développement de ce cancer, il a déjà été démontré une coopération entre les rayons ultraviolets de type B (UVB) et l'infection par les papillomavirus humains cutanés. Les personnes immunodéprimées sont très sensibles à ce type de cancer de la peau, soulignant l'importance du système immunitaire dans la protection tumorale.

Cette étude a pour but d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de la coopération des UVB et l'expression de protéines du papillomavirus humain (oncoprotéines impliquées dans la transformation tumorale) dans la carcinogenèse de la peau. Pour cela nous utiliserons un modèle de souris transgéniques, exprimant de manière constitutive ces oncoprotéines dans les kératinocytes présents dans l'épithélium. La mise en place des réponses immunitaires ainsi que son étroite régulation sera étudiée avant et après exposition aux UVB chez ces souris transgéniques comparé à des souris contrôles. En particulier nous étudierons à des temps précoces : 1- les cellules de la peau exposées aux UVB, qui seront analysées par des techniques de biologie moléculaire, 2- l'impact de l'effet cumulatif de ces irradiations sur les réponses immunitaires afin de comprendre et d'expliquer le développement tumoral à long terme et enfin 3- le dérèglement du système immunitaire causés par les UVB.

Afin de réaliser les irradiations, les souris seront anesthésiées. Les zones des animaux non dédiées à l'irradiation (zone protégée > 95% de la surface totale de la souris) seront protégées des UVB par une plaque en métal réalisée sur mesure.

Le projet nécessitera l'utilisation de 240 souris. Le choix du modèle souris est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, la réponse immunitaire provoqué par les UVB est un phénomène biologique complexe et dynamique, faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

14201 Le but du laboratoire est d'élucider les mécanismes de mise en place et de maintien des circuits neuronaux. Ceci implique de comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent (i) la différenciation neuronale, (ii) le déploiement de neurones ayant des caractéristiques similaires vers leurs cibles cellulaires appropriées et la reconnaissance de ces cibles, permettant (iii) la transmission neuronale et le bon fonctionnement du circuit pour le traitement de l'information. Ces mécanismes sont basés sur des interactions tissulaires complexes qui nécessitent des études dans le contexte physiologique de l'animal. Le poisson zèbre permet d'étudier en microscopie de fluorescence la mise en place de ces circuits ainsi que leur fonctionnement et de corrélérer cette compréhension cellulaire au comportement de l'animal. Ce modèle animal permet donc de connecter les niveaux moléculaires et cellulaires à l'organisme dans son intégrité et sa complexité en analysant les circuits neuronaux *in vivo* dans leur environnement intact chez un vertébré, et ce sans nécessiter d'approches expérimentales invasives.

Le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet sur lequel travailleront 8 chercheurs pendant 5 ans est de 5325 animaux (3920 larves d'1 semaine, 670 larves de 2 semaines et 735 adultes). Les poissons-zèbres adultes ne sont utilisés que pour la production d'embryons. La grande majorité des expérimentations animales sera effectuée sur des larves. Le stade larvaire du poisson zèbre va d'environ 3 jpf (jours post fécondation) à 21jpf. Nous utiliserons principalement des techniques d'imagerie, méthode non invasive, sur des larves intactes anesthésiées. Ceci ne cause aucune souffrance particulière aux larves. De plus, nous manipulerons avec extrême précaution ces larves, car nos projets (analyse de l'activité neuronale notamment) demandent le minimum de perturbation possible pour récolter des données fiables.

Nous aurons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

Remplacement : Les études en culture cellulaire ne permettent pas de reconstituer les interactions cellulaires complexes permettant d'analyser la mise en place et la fonctionnalité d'un circuit neuronal. La complexité structurelle et fonctionnelle du système nerveux empêche l'utilisation des modèles *in silico* ou *in vitro*, notre projet nécessite donc une approche *in vivo* sur l'animal. Le choix d'un modèle de petit poisson de remplacer l'expérimentation sur des mammifères. Le poisson zèbre *Danio rerio* a été choisi pour la possibilité de générer des lignées génétiquement modifiées, sa petite taille et la transparence de sa larve qui permettent des analyses non invasives sur l'animal vivant, notamment en microscopie.

Réduction : Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Les expériences sont réalisées sur des larves, qui sont euthanasiées immédiatement après la fin des expériences. Quand cela est possible nous utilisons les mêmes larves pour différentes expériences, afin de répondre aux questions des différents projets diminuant d'autant le nombre d'individus nécessaires. Les pontes générant un grand nombre d'embryons, nous euthanasions la plupart de ces embryons pour n'élever que le nombre minimal d'embryons nécessaires au maintien d'une lignée (35 adultes). La population adulte de poissons utilisée pour produire les embryons est ainsi restreinte pour limiter le nombre d'animaux mais suffisamment développée pour assurer des conditions de reproduction efficaces pour les études envisagées et optimales pour le maintien de la diversité génétique (éviter la consanguinité).

Raffinement : Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux chez lesquels nous n'attendons aucune souffrance particulière. Les autres manipulations, plus invasives ou nécessitant une immobilisation, seront conduites sur animaux anesthésiés. Dans chaque cas, nous suivrons les signes visibles d'un animal souffrant et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience ou à une euthanasie. Concernant l'élevage, des poissons trop vieux pour la ponte ou présentant des signes de maladie seront euthanasiés afin d'éviter tout risque de souffrance.

14202 Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus* - SA) est l'espèce de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. C'est une bactérie commensale de l'homme, qui colonise environ 30% des sujets caucasiens, principalement au niveau nasal et cutané.

C'est notamment lorsque la barrière cutanée est rompue à l'occasion d'une blessure ou lors d'une opération chirurgicale, que cette bactérie va causer des infections de localisation et de sévérité variées, allant de l'infection suppurative (furoncle) à l'infection d'organes internes aggravée par la production de toxines (ostéomyélite, endocardite). Les pneumopathies associées à SA sont quant à elles relativement rares mais particulièrement néfastes.

La prise en charge thérapeutique des infections causées par SA reste difficile du fait d'une prévalence de la résistance aux antibiotiques encore élevée. En effet, il est possible de différencier deux grandes classes de SA : les SA Résistants à la Méricilline (MRSA) et les SA Sensibles à la Méricilline (MSSA). Du fait d'une multirésistance associée, et en dépit d'une diminution de la prévalence de ces souches résistantes en Europe et aux Etats Unis au cours de ces dernières années, les MRSA demeurent une priorité de santé publique.

Outre sa résistance aux antibiotiques, SA est également équipé d'un large panel de toxines. Parmi elles figurent des toxines capables d'endommager la membrane cellulaire par la formation de pores ; ce sont les "pore forming toxins". La plus connue est l'alpha-hémolysine (Hla), mais plus récemment ont été identifiées cinq leucocidines à deux composants : les gamma-hémolysines AB et CB (HlgAB, HlgCB), les leucocidines ED (LukED) et GH (LukGH ou LukAB) et la Leucocidine de Panton-Valentine (PVL or LukSF-LukPV).

Le lapin qui, contrairement au modèle murin, présente les mêmes caractéristiques de sensibilité aux toxines que l'homme, représente un modèle de choix pour l'étude de la pneumonie nécrosante à SA producteur de PVL.

Le but du projet est d'évaluer la virulence de 10 souches de *S. aureus* :

- La souche nommée ST80 a été modifiée génétiquement afin de créer 7 mutants ne divergeant que par leur capacité à produire 3 différentes toxines (Hla, Hlg et PVL).

- La souche PEN a elle aussi été modifiée afin de créer 1 mutant délété en Hlg.

La virulence de chaque souche (mutée ou non) sera testée dans un modèle de pneumonie chez le lapin, ceci afin d'évaluer la contribution respective de chacune des toxines exprimées par *S. aureus* et ainsi envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cette étude impliquera 2 x 12 lapins qui serviront à déterminer la charge bactérienne des souches mères (non mutées) nécessaire pour atteindre la virulence souhaitée, ainsi que 5 lapins par souches mutées (8) pour un total de 64 animaux.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R :

Remplacer : Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* (comparaison des caractéristiques de survie et de vitesses de croissance des souches) mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire, nécessitant donc l'utilisation de modèles animaux.

Réduire : La première partie de l'étude correspond à une étude pilote et ne sera réalisée que sur les souches mères. Ces souches étant normalement les plus virulentes, elles ne nécessiteront que 3 lapins par groupe afin de sélectionner la charge bactérienne cible qui sera utilisée pour toutes les autres souches. La phase principale de l'étude demandera 5 lapins par groupe car les différences attendues entre les souches mutées sont faibles.

Raffiner : La totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (inoculation intratrachéale et mises à mort) sera réalisée sous anesthésie générale. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi.

14203 La plateforme d'imagerie dispose de plusieurs appareils acquis récemment afin de pouvoir réaliser des modèles expérimentaux chez le petit animal. Dans le cadre de la formation et de son rôle de plateforme et de son appartenance à des réseaux nationaux de biologie, nous voulons proposer aux personnes utilisatrices de la plateforme, une formation afin de réaliser en autonomie des injections intracérébrales, des poses de cathéter intravasculaire pour des études de pharmacodynamie *in vivo* sous imagerie TEP (tomographie par émission de positons). La pharmacodynamie permet l'étude détaillée de l'interaction entre la substance active testée et sa cible dans l'organisme. La substance active quitte le système sanguin pour diffuser jusqu'au site d'action dans l'organe cible et se combine avec un récepteur, une enzyme ou une structure cellulaire pour provoquer la réponse, l'effet thérapeutique.

L'imagerie permettra de suivre la molécule dans le compartiment et l'organe cible.

200 souris maximum seront utilisées sur 5 ans dans le cadre de cette formation

La règle des 3R sera respectée:

-Réduire: Nous n'utiliserons que le minimum d'animaux nécessaire à l'apprentissage de ces techniques chirurgicales. Nous utiliserons à la fois des souris mâles et femelles permettant ainsi d'optimiser les animaux issus de de l'élevage.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux avec des tubes en plastique, former des groupes sociaux (5 animaux par cages). Des cotons d'ouate sont déposés dans la cage afin de pouvoir fabriquer des nids. La nourriture et l'eau sont données ad libitum. Le cycle jour/nuit est 12/12h. Les animaux sont suivis par un personnel qualifié. La chirurgie est réalisée sous anesthésie et analgésie et un suivi post opératoire des animaux est effectué sur toute la durée de l'étude à l'aide de grille d'évaluation incluant des points limites.

-Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif de cette formation est l'apprentissage de techniques de chirurgie et d'imagerie en autonomie. Cette formation ne peut pas se faire sur des cellules en culture.

14204 Le développement de nouveaux outils technologiques, tels que les accéléromètres en 3 dimensions couplés à des magnétomètres en 3 dimensions inclus dans des colliers fournissant également des localisations GPS, donnent des informations précises et continues sur les déplacements et les

micromouvements des animaux et pourraient permettre d'inférer les séquences comportementales des individus de façon indirecte, ainsi que de reconstruire leur trajectoire spatiale précise. De tels outils ont d'ores et déjà montré leur efficacité pour étudier les dépenses énergétiques chez plusieurs espèces et semblent prometteurs dans le contexte de l'étude du comportement en milieu naturel. D'autres capteurs pourraient fournir des données complémentaires comme la température ou encore des images vidéo (caméras embarquées).

Ce projet vise à valider l'utilisation de tels capteurs et de les calibrer chez le chevreuil, une espèce d'ongulé sauvage abondante qui cohabite avec les activités humaines, afin de les déployer en milieu naturel. Une population de chevreuils en milieu naturel a été ciblée pour un suivi à long-terme depuis plus de 20 ans. Ce suivi vise à comprendre l'influence des pressions anthropiques (chasse, pratiques agricoles, modifications du paysage) sur le comportement et le fonctionnement des populations de chevreuil, le grand herbivore le plus répandu en Europe (autorisation de projet en 2017). L'obtention de données comportementales détaillées tout au long du cycle annuel serait un atout important dans cette perspective. Notamment, le déploiement de ces capteurs en milieu naturel permettra d'étudier les comportements individuels et ainsi d'améliorer notre compréhension du rôle de la variabilité inter-individuelle du comportement dans la réponse des grands herbivores aux changements de leur environnement.

Seule une approche expérimentale sur des animaux vivants permet de valider l'utilisation de capteurs embarqués, en les calibrant par des observations sur le comportement individuel et en testant l'effet de l'ajustement du collier sur les enregistrements obtenus.

Cette expérimentation implique 28 chevreuils en élevage et 6 chevreuils en semi-liberté qui pourront être équipés de colliers avec différents types de capteurs embarqués. Avant, pendant, et après ces événements, les chevreuils poursuivront leur vie habituelle dans leur enclos au contact de leurs soigneurs. Les procédures de capture, de manipulation, et d'observation (film d'observation) sont peu invasives et conçues pour maintenir au maximum le bien être des animaux (méthode de capture éprouvée conçue pour éviter l'affolement des animaux, tranquillisation chimique, entraînement comportemental, renforcement positif, personnel expérimenté et compétent).

L'intérêt scientifique du projet a été confirmé par un comité d'experts et l'ensemble du protocole a été approuvé par la structure bien-être animal de l'installation expérimentale.

14205 L'asthme sévère est un problème de santé publique majeure puisque c'est une pathologie affectant 300 millions de personnes dans le monde. Actuellement, il n'existe aucun traitement pour endiguer cette maladie. Seuls des traitements immunosuppresseurs à large spectre sont utilisés mais présentes de nombreux inconvénients quand ils sont utilisés sur le long terme affectant le bien-être des patients et pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu.

Notre projet de recherche vise à tester un nouvel outil thérapeutique, i. e. un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre le récepteur de la prostaglandine D2 : le récepteur CRTH2. Ce récepteur est exprimé sur les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2). Ces cellules sont pathogéniques car elles sont la source majeure des médiateurs pro-inflammatoires responsables des signes cliniques de l'inflammation pulmonaire chronique : la production de mucus, la vasodilatation et l'attraction des éosinophiles. Notre anticorps thérapeutique a pour but d'éliminer spécifiquement les cellules pathogéniques, les ILC2, dans le contexte de l'asthme.

Ce projet de recherche vise à tester en modèle préclinique chez la souris l'effet thérapeutique de cet anticorps dans le contexte de l'allergie pulmonaire. En effet, CRTH2 est exprimé sur les ILC2 chez l'homme et chez la souris. Le seul modèle animal représentatif de l'allergie pulmonaire se fait chez la souris et consiste en une instillation répétée intra-nasale d'allergène telle que la papaïne pour induire une inflammation allergique sévère dans les poumons (en conformité avec la règle R : remplacement). Dans ce modèle, l'asthme n'est pas observé mais l'infiltration de cellules immunitaires atteste d'une inflammation pulmonaire. Nous pensons que l'utilisation de cet anticorps permettra d'éliminer les ILC2 et donc de guérir de l'allergie pulmonaire avec une réduction de l'infiltration de cellules immunitaires.

Afin d'évaluer l'effet protecteur de l'anticorps spécifiquement dirigé contre le récepteur humain CRTH2, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui expriment le récepteur CRTH2 humain au lieu du récepteur murin (souris knock-in). Les effets protecteurs de l'anticorps candidat seront testés au cours de l'expérience à différents temps pour évaluer la durabilité et l'efficacité du médicament. Nous envisageons une approche conditionnelle pour réduire le nombre de souris à utiliser (en conformité avec la règle R : réduction). Nous testerons une première cohorte de 80 souris humanisées réparties en 4 groupes : des souris traitées avec la papaine recevant ou pas l'anticorps et des souris non traitées recevant ou pas l'anticorps. Chaque groupe représente 5 souris et 4 temps seront analysés [(5 X 4 groupes) X 4 temps] = 80 souris (lot 1). Si le résultat est positif (effet protecteur obtenu), nous répéterons cette expérience une fois pour valider significativement le test (deuxième lot de 80 souris à tester). Si après cette expérience le résultat protecteur n'est pas obtenu sur le lot 1, nous envisageons de tester un autre anticorps anti CRTH2 (avec éventuellement une meilleure efficacité) que nous aurons préalablement sélectionnés (deuxième lot de 80 souris) dans les mêmes conditions que le lot 1. Au total nous utiliserons donc 160 souris.

Pour être en conformité avec les 3R, concernant le raffinement, et réduire au maximum la douleur et la souffrance animale, les souris sont anesthésiées légèrement au vetisoflurane gazeux (4% pour l'induction et 2,5% pour la maintenance et 1,25 L/min air-vetisoflurane) avant tout acte invasif. Les souris seront hébergées en cage standard avec toit filtrant, avec de la sciure de bois utilisée comme litière, des rouleaux de coton comme matériau de nidification et de maisons de souris achetées dans le commerce et fournies pour l'enrichissement environnemental. Les souris sont nourries et ont accès à un bidon d'eau ad libitum, et sont libres de leur déplacement.

Une surveillance journalière est réalisée dans notre animalerie par des spécialistes animaliers permettant de parer aux besoins nécessaires au bien-être des animaux. Un soin particulier sera apporté pour éviter la souffrance des animaux par la surveillance de signes extérieurs tels que : léthargie, poil hérissé, comportement asocial, dos courbé, animal se déplaçant difficilement, perte de poids supérieure ou égale à 20% de son poids initial et finalement la respiration à plat et tendue. L'atteinte d'un de ces points limite entraînera la décision d'euthanasie des animaux concernés.

14206 Les angiomes caverneux ou CCM sont des malformations vasculaires localisées principalement dans le cerveau des patients. Cette maladie touche 0. 1-0. 5% de la population. Dans 20% des cas, la maladie est héréditaire, causée par la mutation d'un des 3 gènes CCM identifiés. La maladie est évolutive, puisque le nombre et la taille des lésions augmentent au cours de la vie. Les malformations peuvent entraîner des crises d'épilepsie et/ou des troubles neurologiques dus à des hémorragies cérébrales répétées. L'unique traitement curatif possible est la neurochirurgie, qui se révèle impossible si la malformation est trop profonde, ceci en raison de risque vital pour le patient. Il est donc urgent de trouver des médicaments empêchant le grossissement des lésions existantes, voire même de les faire disparaître et ainsi diminuer le risque hémorragique. Ce projet, d'une durée de 5 ans, s'inscrit dans le cadre d'un réseau européen et se fait en lien étroit avec plusieurs associations de patients en France et à l'étranger qui mettent beaucoup d'espoir dans le développement de ces traitements médicamenteux.

La souris possède toute la complexité du réseau vasculaire cérébral trouvé chez l'Homme et les outils nécessaires pour induire une mutation dans l'un des gènes CCM sont disponibles. Il existe un modèle CCM chez la souris dans lequel les malformations vasculaires cérébrales se développent lentement et progressivement de façon similaire à ce qui est retrouvé chez les patients. Ce modèle animal est indispensable aujourd'hui pour réaliser des essais thérapeutiques pré-cliniques. Cependant, certains animaux décèdent avant l'âge adulte.

Le premier objectif de ce projet est de réaliser des tests limités (32 souris maximum) pour vérifier si un nouveau modèle récemment obtenu permet le développement de la maladie de façon équivalente au modèle CCM déjà décrit précédemment, mais avec une meilleure survie des animaux. Dans l'affirmative, ce nouveau modèle CCM sera aussitôt utilisé pour réduire le nombre d'animaux CCM du projet.

Le deuxième objectif du projet est d'évaluer l'effet curatif potentiel de médicaments au cours d'essais précliniques dans le modèle souris CCM retenu.

Toutes les procédures expérimentales sont mises en œuvres par des personnes expérimentées et sont utilisées depuis de nombreuses années. La procédure n°1 consiste en une injection unique sur animal vigile d'un composé permettant d'inactiver l'un des gènes CCM et de déclencher le développement de la maladie chez la souris. Cette procédure concernera la totalité des animaux du projet (total de 312 souris maximum). Le nombre d'animaux nécessaire pour conclure sur nos différentes expériences a été calculé par des tests statistiques de puissance.

La procédure n°2 (implantation sous cutanée d'un dispositif diffusant le composé thérapeutique sur animal anesthésié) a pour but d'administrer un traitement de façon diffuse sans manipulation répétée de l'animal sur 21-28 jours consécutifs. L'efficacité d'un composé thérapeutique candidat sera évaluée en comparant le nombre et la taille des lésions chez des animaux non traités et traités (analyse statistique de comparaison de 2 groupes). Tous les animaux concernés par l'essai thérapeutique sont analysés à 4 mois.

Un maximum de deux prélèvements sanguins sur animal anesthésié sera réalisé avec un intervalle d'un mois entre chaque prélèvement.

Les animaux sont maintenus dans les conditions recommandées d'hébergement avec enrichissement systématique (maison et papier cartonné). Dès leur naissance, les animaux seront surveillés quotidiennement et feront l'objet d'un examen clinique hebdomadaire approfondi (suivi du poids, comportement et aspect de l'animal). Des critères de points limites ont été prédéfinis de façon à déceler tout signe précoce de souffrance éventuel. Un traitement antidouleur est administré en cas de détection d'un signe de souffrance et en cas de persistance de douleur au-delà de 2 jours l'animal sera euthanasié puis analysé. Tous les animaux du projet seront euthanasiés pour permettre leur analyse.

14207 Le « moyamoya » est une maladie rare des vaisseaux du cerveau. Elle se caractérise par une réduction anormale et progressive du diamètre des gros vaisseaux entrants dans le crâne et s'étend parfois aux vaisseaux de la base du cerveau. En conséquence, le manque d'oxygène dans le cerveau entraîne le développement de nouveaux petits vaisseaux anormaux, fins et denses, en forme de « nuage de fumée » (traduction de « moyamoya » en Japonais). L'âge de début du moyamoya est variable avec cependant deux pics d'apparition, chez le jeune enfant et chez les adultes vers 40 ans. Cette maladie entraîne des maux de tête sévères et des accidents vasculaires cérébraux. Il n'existe pas de médicament pour stopper l'évolution de la maladie. On ne comprend pas aujourd'hui comment se développe la maladie humaine et il n'existe aucun modèle animal. Au cours des dernières années, plusieurs gènes impliqués dans cette maladie ont pu être identifiés chez l'homme. Pour permettre aujourd'hui de faire avancer les connaissances, des modèles animaux de la maladie sont indispensables. Aucune autre alternative n'est actuellement disponible permettant l'étude des mécanismes de développement de cette maladie. La souris est un animal qui possède des vaisseaux cérébraux très semblables à ceux trouvés chez l'homme. Il existe des souris mutées dans certains gènes identifiés dans le moyamoya chez l'homme mais aucune analyse de leurs vaisseaux cérébraux n'a encore été réalisée. A ce jour, aucun signe de souffrance n'a été répertorié chez ces lignées. L'objectif de cette étude est de déterminer si l'une de ces lignées de souris pourrait être un bon modèle de moyamoya. Dans le cas où un modèle adéquat serait identifié, cette étude permettra de mieux comprendre comment se développe la maladie au cours du temps. Nos résultats pourront être à l'origine d'approches médicamenteuses nouvelles et bénéfiques pour les patients. La durée du projet est de 5 ans.

La procédure expérimentale contenue dans ce projet consiste essentiellement en l'injection chez l'animal d'un composé permettant d'inactiver l'un des gènes du moyamoya afin d'analyser si cela déclenche la maladie chez la souris, comme c'est le cas chez l'homme. Cette procédure sera réalisée par des personnes formées et expérimentées, soit chez le souriceau nouveau-né soit chez l'animal de 1 mois, pour mimer la maladie humaine apparaissant soit chez les enfants soit chez les adultes.

Dix souris par lignée moyamoya candidate seront analysées et le nombre de contrôles sera réduit à 3 animaux par lignée. Ce nombre d'animaux permettra d'écartier une lignée qui n'aurait révélé aucune anomalie des vaisseaux cérébraux et de réaliser des tests statistiquement fiables sur des paramètres quantifiables en cas d'anomalie présente (tests de comparaison de 2 groupes pour comparer les animaux contrôles et moyamoya). Chaque lignée moyamoya candidate sera analysée à différents temps (chez le souriceau, le jeune puis l'adulte) pour permettre de caractériser l'évolution de l'anomalie vasculaire au cours du temps. Le nombre total d'animaux pour l'ensemble du projet sera au maximum de 320 souris (6 lignées moyamoya candidates seront analysées à plusieurs temps différents: chacune comprenant 10 souris 'moyamoya' et 3 souris 'contrôle').

Les animaux sont maintenus dans les conditions recommandées d'hébergement avec enrichissement systématique (maison et papier cartonné) et seront surveillés quotidiennement. Ils feront l'objet d'un examen clinique hebdomadaire approfondi (suivi du poids, comportement et aspect de l'animal). Des critères de points limites ont été prédéfinis de façon à déceler tout signe précoce de souffrance éventuel. Un traitement antidouleur sera administré en cas de détection d'un signe de souffrance et en cas de persistance de douleur au-delà de 2 jours l'animal sera soumis à une anesthésie profonde entraînant son décès puis analysé. Tous les animaux seront euthanasiés en fin de procédures afin de permettre l'analyse.

14208 Dans le cadre de l'évaluation de l'écotoxicité de substances sur le compartiment aquatique, le laboratoire utilise des essais conduits selon les protocoles OCDE 203 et OCDE 215 sur poissons (Danio Rerio) uniquement lorsque le fabricant le demande. Les produits soumis à essais sont essentiellement des produits chimiques industriels, et les études réalisées s'inscrivent dans le cadre de dossiers d'autorisation réglementaire ou d'étiquetage.

Selon la décision du demandeur de l'essai, et suivant la réponse écotoxique du produit soumis à essai, l'application du protocole OCDE 203 conduit à utiliser entre 28 et 54 poissons, et l'application du protocole OCDE 215 entre 80 et 160. Au total, sur la durée du projet (5 ans), le laboratoire estime employer un nombre maximum de 2500 animaux.

Le principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) est suivi de la façon suivante :

- Remplacer : le laboratoire utilise d'autres méthodes d'essai lorsque cela est possible. Il propose systématiquement un essai sur embryons selon OCDE 236 en méthode alternative, aux fabricants qui demandent des essais sur poissons. Dans le cadre de programmes de recherche, aucun essai sur vertébrés n'est réalisé, l'écotoxicité étant évaluée sur d'autres organismes comme les algues (selon OCDE201) et les daphnies (selon OCDE202).

- Réduire : l'installation d'essais suit strictement le nombre de poissons indiqué dans les protocoles OCDE. Les poissons utilisés dans les aquarium témoins sont systématiquement placés en fin d'étude. Dans l'intérêt de leur bien-être, il est important d'éviter ou de réduire l'utilisation des animaux chaque fois que cela est possible et approprié. Un essai limite sur une seule concentration peut suffire lorsqu'aucune toxicité n'est mise en évidence dans les essais préliminaires.

- Raffiner : Les poissons proviennent d'un élevage disposant également d'un agrément. Les sachets contenant les poissons sont pré acclimatés pendant environ ½ à 1 heure avant leur ouverture dans un aquarium qui leur est dédié (les lots ne sont jamais mélangés). L'eau contenue dans les sachets ne doit pas être versée dans l'aquarium, elle peut être analysée (T°C, pH, ammoniac...) pour avoir un avis sur le bon déroulement du transport. Ces critères pourront être notés en commentaire dans le registre tenu par le laboratoire. Le contrôle de la qualité de l'eau des aquariums est géré sous assurance qualité. L'installation est suivie et contrôlée par un vétérinaire spécialisé. Un suivi de la mortalité naturelle des poissons par lot est réalisé. Les aquariums sont équipés de poster « fond d'aquarium » pour le raffinement. En revanche, aucune décoration plastique ou naturelle n'est introduite dans l'aquarium afin d'éviter l'apport de maladie dans l'élevage. Les aquariums de stabulation sont installés dans une pièce dédiée, équipée d'un éclairage automatisé. Les perturbations (vibrations ou bruit excessifs, par exemple) sont par conséquent réduites autant que possible.

L'utilisation des poissons dans les essais est requise dans le cadre de la classification et l'étiquetage des produits chimiques selon le règlement n° 1272/2008 auquel tout fabricant doit se conformer.

Le laboratoire propose en alternative des essais sur embryons de poissons selon l'OCDE 236.

Les poissons utilisés en témoin sont systématiquement placés.

14209 Les neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie, effets indésirables fréquents de nombreux agents anticancéreux, se caractérisent notamment par des douleurs chroniques importantes affectant durablement la qualité de vie des patients et entraînant des adaptations posologiques avec le risque d'une efficacité clinique amoindrie. Parmi ces composés, l'oxaliplatine largement utilisée dans le traitement de plusieurs tumeurs solides dont le cancer colorectal, induit une neurotoxicité aiguë quasi systématique qui persiste chez plus de 30% des patients. La physiopathologie est encore mal comprise et aucun traitement préventif ou curatif efficace n'est disponible.

La famille des canaux ioniques HCN (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated) comprend quatre membres (HCN1-4), qui sont largement distribués dans les voies de la douleur, jouent un rôle important dans le développement et le maintien de la douleur neuropathique et représentent donc d'excellentes cibles pour la recherche de nouveaux médicaments antalgiques. Des bloqueurs non sélectifs de ces canaux ont démontré un effet antalgique dans des modèles de neuropathie chez le rongeur. Leurs effets indésirables cardiaques limitent toutefois la translation clinique de leur utilisation chez les patients. L'utilisation thérapeutique de bloqueurs des canaux HCN nécessite donc le développement de médicaments sélectifs pour les sous-types de canaux HCN afin d'obtenir une efficacité antalgique exempte d'effets indésirables, notamment cardiaques. Une nouvelle stratégie étudiée au laboratoire et basée sur la modulation de la fonction du canal HCN en perturbant ses interactions avec ses sous-unités auxiliaires pourrait conduire au développement d'un traitement antalgique innovant et bien toléré, en particulier sans effets cardiaques. L'objectif principal de ce projet repose sur le développement de cette nouvelle stratégie antalgique basée sur la modulation de la fonction des canaux HCN.

Ce projet a pour buts, à partir d'une approche multidisciplinaire de (i) consolider la preuve de concept obtenue au laboratoire et de renforcer nos connaissances sur l'implication des canaux HCN et leur protéines partenaires dans la physiopathologie des douleurs chroniques et de (ii) valider une molécule lead, parmi les molécules synthétisées par nos collaborateurs chimistes, dont les propriétés antalgiques permettront de proposer la maturation d'un nouvel antalgique efficace et bien toléré pour traiter et/ou prévenir les douleurs neuropathiques induites par la chimiothérapie neurotoxique. Le projet utilisera au maximum 1592 animaux (incluant des rats et des souris) sur 5 ans. Aucune méthode alternative non-animale n'est ici adaptée. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre le nombre d'animaux est limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs. Par ailleurs, différents tests peuvent être appliqués successivement à un même animal, permettant ainsi de raffiner et réduire le nombre d'animaux nécessaire au projet. Les anesthésiques utilisés lors de la chirurgie permettent d'avoir une bonne couverture analgésique pendant et après la chirurgie. Les injections seront effectuées par du personnel compétent et selon les bonnes pratiques de l'expérimentation animale. Si besoin, en cas de signe de douleur sans atteinte des points limites, les animaux seront traités avec un antalgique. Enfin, le milieu dans lequel les animaux évolueront sera enrichi (tunnel de carton, copeaux permettant de nicher...). Les espèces choisies sont celles qui sont les plus utilisées dans les travaux de recherches sur la thématique. La méthode de mise à mort prévue est la dislocation cervicale après anesthésie gazeuse à l'isoflurane à l'aide d'un appareil adapté.

14210 La douleur a un impact majeur sur la qualité de vie et conduit à des troubles neuropsychiatriques (troubles du sommeil, anxiété, dépression, troubles cognitifs.) chez 70% des patients. Les questions sociétales et économiques sont également cruciales car 60 % des personnes souffrant de douleur chronique sont moins aptes voire incapables de travailler et 20 % déclarent avoir perdu leur emploi à cause de la douleur.

Les traitements médicamenteux disponibles manquent d'efficacité, sont à l'origine de nombreux effets indésirables et appartiennent pour la quasi-totalité à d'anciennes classes de composés (opioïdes, AINS, antidépresseurs...). Ceci justifie la recherche d'analgésiques originaux avec de nouveaux modes d'action visant à répondre aux besoins non satisfaits des patients.

Nous avons identifié et breveté une nouvelle classe d'analgésiques qui ciblent un canal potassium et des données préliminaires nous permettent d'émettre l'hypothèse que ces composés ne présentent pas les effets indésirables généralement induits par les morphiniques pour le traitement de la douleur chronique. Les objectifs du projet visent à compléter la phase de découverte, à optimiser les composés lead sélectionnés, et à sélectionner des molécules pour les phases de développement préclinique. Le nombre maximal d'animaux (rats et souris) nécessaires est estimé à environ 2280. Aucune méthode alternative non-animale n'est ici adaptée. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre de animaux est limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs. Par ailleurs, différents tests peuvent être appliqués successivement à un même animal, permettant ainsi de raffiner et réduire le nombre d'animaux nécessaire au projet. Si besoin, en cas de signe de douleur sans atteinte des points limites, les animaux seront traités avec un antalgique. Les anesthésiques utilisés lors de la chirurgie permettent d'avoir une bonne couverture analgésique pendant et après la chirurgie. Les injections seront effectuées par du personnel compétent et selon les bonnes pratiques de l'expérimentation animale. Enfin, Le milieu dans lequel les animaux évolueront sera enrichi (tunnel de carton, copeaux permettant de nicher...). Les espèces choisies (rats et souris) sont celles qui sont les plus utilisées dans les travaux de recherches de screening pharmacologique *in vivo*. La méthode de mise à mort prévue est la dislocation cervicale après anesthésie gazeuse à l'isoflurane à l'aide d'un appareil adapté.

14211 Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans le monde avec près de 8,8 millions de décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les traitements courants comprenant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie sont lourds pour les patients et leurs résultats ne sont pas garantis. La raison principale étant qu'il est aujourd'hui encore très difficile de cibler uniquement mais intégralement les cellules cancéreuses.

Les bactéries utilisées dans cette étude ont pour objectif de cibler les tumeurs et de délivrer en leur sein, des molécules anti-cancéreuses. Pour cela, ces bactéries ont été modifiées afin de réduire leur virulence, ainsi elles seront inoffensives dans un environnement sain (système immunitaire normal) mais proliféreront dans un environnement tumoral (système immunitaire perturbé). Ce qui en fait d'excellents transporteurs de molécules anti-cancéreuses.

Le but de cette étude est de comparer la toxicité aiguë de 2 lots de ces bactéries chez le lapin sain après administration par voie intra-veineuse. Ces 2 lots, supposés identiques, présentent cependant des taux d'endotoxine différents, dont il est nécessaire de vérifier l'impact sur la toxicité de ces bactéries dans un modèle *in vivo*.

Des études de toxicité aiguë et chronique ont déjà été réalisées chez le lapin sain avec le lot de bactéries le plus ancien. Avant de poursuivre les études, il faut s'assurer que le nouveau lot, comportant plus d'endotoxines que le précédent, n'est pas plus toxique.

8 lapins seront nécessaires à la réalisation de cette étude :

-Lot 1 (ancien) : 4 Lapins

-Lot 2 (nouveau) : 4 Lapins

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R :

Remplacer : Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* (comparaison des taux d'endotoxine) mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles animaux.

Réduire : Les études précédentes ont permis de sélectionner une seule dose de bactéries limitant ainsi le nombre d'animaux impliqué dans l'expérience. La différence de toxicité attendue entre les lots étant tout de même faible, 4 animaux par groupe seront nécessaires.

Raffiner : La totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections intra-veineuses et mises à mort) sera réalisée sous anesthésie locale ou générale. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi.

14212 Les vertiges peuvent être liés à des atteintes du système nerveux périphérique et notamment des organes de l'oreille interne, ou à une atteinte au niveau du nerf VIII. Dans tous les cas, des mécanismes cellulaires compensatoires sont mis en jeu afin de résoudre les symptômes comportementaux qui suivent l'apparition de la pathologie. Ce phénomène appelé compensation vestibulaire constitue le thème central du présent projet.

Nous chercherons au cours de ce projet à déterminer si la neurogénèse vestibulaire se produit chez les rongeurs, souris et rats, et testerons son apparition suite à une lésion périphérique. Dans le cas où cette neurogénèse serait présente, nous déterminerons les types de neurones nouvellement formés et testerons leur insertion au sein des réseaux pré-existants, l'objectif étant de déterminer quelle part de la récupération fonctionnelle dépend de la formation de nouveaux neurones.

Le projet comprend 3 procédures : une chirurgie préliminaire de l'oreille interne permet de déclencher la compensation vestibulaire. La seconde procédure consiste en l'injection d'un produit qui marquera les nouveaux neurones formés. Enfin la dernière procédure consiste en la fixation du cerveau afin de permettre la caractérisation anatomique de la neurogénèse et l'exploration électrophysiologique sur tranche des neurones nouvellement formés.

Un total maximum de 150 rats et de 300 souris, soit 450 rongeurs, sera nécessaire à ce projet.

Le projet respecte la règle des 3R: afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des évaluations statistiques des résultats seront effectuées périodiquement afin de n'utiliser que le nombre d'animaux statistiquement nécessaire.

Raffinement : chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée. Les interventions chirurgicales se dérouleront sous anesthésie générale avec des antalgiques en pré et post-opératoire. Des points limites évalués ont été établis en amont et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum".

Au final, ce projet de recherche fondamentale permettra de mieux comprendre le phénomène de neurogénèse et la capacité des réseaux de l'équilibre à intégrer de nouvelles cellules pourraient faire de la thérapie cellulaire une nouvelle stratégie de la prise en charge de vertiges, suite à des lésions vestibulaires périphériques (névrites vestibulaires ou neurinomes) ou centrales (accident ischémique cérébral).

14213 L'épilepsie recouvre plusieurs maladies neurologiques ayant pour point commun la répétition de crises épileptiques spontanées. Ces crises sont liées à une activité électrique anormale des cellules du système nerveux central. En France, environ 500000 personnes sont touchées par une épilepsie qui peut débuter à tous les âges de la vie. L'épilepsie souffre d'une image péjorative dans la société, liée en partie à une méconnaissance de la maladie. Bien que les traitements pharmacologiques soient efficaces sur certains patients, on estime à 30% la proportion de patients épileptiques réfractaires aux médicaments. Chez ces patients pharmaco-résistants, il existe un risque élevé de mort soudaine liée à l'épilepsie, caractérisée par un arrêt des fonctions cardiaque et respiratoire. Les causes de cette mort soudaine sont encore mal comprises et il n'existe aucune méthode pour lutter contre cette mortalité. Notre hypothèse de travail est que la neurostimulation vagale pourrait être utilisée efficacement pour contrecarrer l'arrêt cardio-respiratoire lié à l'épilepsie. Afin de tester cette hypothèse, il est nécessaire de disposer d'un modèle animal reproduisant la mort soudaine liée à l'épilepsie.

Le présent projet vise à réaliser un élevage de souris déficientes en canaux potassique de type Kv1. 1 (souris KO Kv1. 1) et à maintenir cette lignée. Ces souris génétiquement modifiées

constituent un modèle expérimental reconnu de mort soudaine liée à l'épilepsie. Seules les souris homozygotes (Kv1. 1-/-) développent des crises d'épilepsie spontanées vers l'âge de 5 semaines, associées à une mortalité d'environ 50% au même âge. Cependant, il est prévu que toutes les procédures expérimentales (depuis l'élevage jusqu'aux expériences en laboratoire) se déroulent avant l'apparition du phénotype dommageable, soit à la 4ème semaine post-natale.

Le plan d'élevage proposé est le suivant: 1 mâle hétérozygote sera hébergé avec 1 femelle hétérozygote. L'index de prolificité moyen est de 6 souris avec un rapport mâle-femelle de 1:1. Afin de respecter les règles éthiques, nous appliquerons la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum grâce à une feuille de calcul fournie en annexe. Le nombre de souris nécessaire pour l'élevage et le maintien de la lignée KO Kv1. 1 est estimé à 224 pour l'ensemble du projet. Les animaux seront observés quotidiennement et une attention particulière sera accordée aux procédures de raffinement. Les souris disposeront de nids végétaux à base de fibres courtes de coton (neslets), utilisés comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de stimuler l'activité, de procurer un sentiment de sécurité et de réduire le stress chez l'animal.

14214 Le virus Lassa (LASV) a un impact significatif sur la santé et l'économie des pays d'Afrique de l'Ouest, infectant environ 500000 personnes chaque année. LASV est responsable d'environ 6000 morts par an, avec des taux de fatalité atteignant près de 50% chez les jeunes enfants. De plus, 20% des survivants présentent des complications long-terme, notamment un déficit auditif. Bien qu'étant un problème de santé publique majeur dans les pays endémiques, il n'existe à ce jour aucun vaccin pour prévenir les infections à LASV et aucun traitement complètement efficace. Le développement de vaccin LASV a notamment été ralenti par le manque de connaissance sur ce pathogène de classe 4. Le projet de recherche translationnelle se concentre sur une meilleure compréhension des infections à arénavirus et sur le développement de contre-mesures. En ce sens, nous avons rationnellement développé des vecteurs recombinants basés sur une souche vaccinale du virus de la rougeole (MeV) exprimant des antigènes de LASV. Dans le cas des FHV dont fait partie la FL, il est impossible de remplacer les modèles animaux afin de réaliser des études sur la physiopathogénèse et les réponses immunitaires dans leur ensemble. Leur innocuité, leur immunogénicité et leur efficacité ont été démontrées chez le singe cynomolgus ont permis de sélectionner le meilleur candidat vaccin, pour son développement vers des phases cliniques. Dans ce but, nous proposons un projet de recherche fondamentale d'une durée de 5 ans afin de démontrer que ce candidat vaccin induit une immunité protectrice qui perdure dans le temps tout en respectant la règle des 3R (remplacement, raffinement et réduction). De plus, ce projet vise à démontrer l'efficacité de vaccins contre une infection fatale par LASV, ce qui nécessite nécessairement des organismes entiers. Un total de 11 singes cynomolgus sera utilisé. Afin d'obtenir des résultats statistiques significatifs et robustes tout en respectant la règle des 3R, les animaux seront répartis en 3 groupes de 4 ou 3 animaux. Le groupe 1 sera composé de 4 singes vaccinés une fois (prime) avec le candidat vaccin et infectés par Lassa ; le groupe 2 de 4 singes vaccinés deux fois (prime + boost) par le candidat vaccin et infectés par Lassa ; le groupe 3 de 3 singes contrôles vaccinés avec le vaccin contre la rougeole et infectés par Lassa. Les singes seront équipés d'implants permettant d'avoir en temps réel le suivi de température et d'activité. Ces mesures seront très utiles pour valider l'efficacité du vaccin (et son innocuité après l'immunisation), puisque la fièvre est le signe clinique le plus évident à objectiver chez le singe infecté par le virus Lassa. Les animaux ne seront pas manipulés vigiles, uniquement sous anesthésie lors desquelles les prises de poids, de température et les prélèvements de sang seront réalisés (une attention particulière sera portée lors des prélèvements de sang afin d'éviter la formation d'hématome grâce à de longs points de compression et la pose d'une pommade anti-oedémateuse locale). Un vétérinaire sera d'astreinte pendant la durée de l'expérimentation et interviendra si nécessaire. Une attention sera également portée sur l'enrichissement alimentaire, de confort et de stimulation. Les résultats obtenus précédemment sur ce modèle nous permettent d'anticiper la dégradation de l'état de santé des animaux et de prendre les mesures nécessaires pour réduire l'état de souffrance des animaux dès que le point limite est atteint. Si la vaccination des animaux un an avant infection virale se révèle efficace, l'infection après vaccination ne devrait

pas avoir d'effet néfaste chez les animaux vaccinés par le candidat vaccin. Seuls les 3 contrôles présenteront alors des effets néfastes sévères, notamment des changements de température corporelle, une perte de poids, une baisse de l'alimentation et de l'hydratation ainsi qu'une baisse de tonus. Les animaux atteignant le point limite au niveau du score clinique ou atteignant le terme de l'expérimentation seront anesthésiés puis euthanasiés afin de procéder à une nécropsie avec collecte d'échantillons.

14215 L'hippocampe est une structure importante pour les processus cognitifs tels que l'apprentissage et de mémoire. Il a été démontré qu'il existe dans cette région une production continue de nouveaux neurones tout au long de la vie (neurogenèse adulte) et que ces neurones jouent un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire. Notre projet général est de comprendre comment ces nouveaux neurones s'intègrent dans le réseau hippocampique et quels facteurs favorisent ou perturbent leur genèse et leur intégration.

Plus spécifiquement, le projet proposé a pour but d'étudier le rôle du récepteur aux endocannabinoïdes CB1 dans la neurogenèse adulte, et son implication dans les effets de l'exercice physique, l'un des plus puissants régulateurs positifs de la neurogénèse. Ce récepteur est exprimé au niveau de la membrane plasmique, mais on peut le trouver dans d'autres compartiments intracellulaires comme les mitochondries. Certaines études ont montré que CB1 peut réguler positivement la prolifération cellulaire et favoriser l'intégration des neurones, mais il reste à déterminer l'influence respective du CB1 membranaire et du CB1 mitochondrial.

Pour répondre à cette question, nous avons prévu 3 groupes d'expériences visant 1) à étudier l'implication du récepteur CB1 mitochondrial ; 2) à étudier la récupération d'un phénotype normal chez des souris déficientes en CB1 après ré-expression de la forme mitochondriale ou membranaire du CB1 ; 3) à étudier l'implication du CB1 (membranaire ou mitochondrial) dans les modifications induites par l'exercice physique.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de 1400 souris.

Afin de respecter le R de réduction, des analyses statistiques précises seront réalisées en vue de déterminer précisément le nombre minimum de souris nécessaire pour obtenir un résultat significatif. Dans un souci de Raffinement, les interventions seront réalisées par du personnel expert de façon à réduire au maximum l'inconfort des animaux et l'ensemble des intervenants portera une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, de soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée au cours des étapes de chirurgie. Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. Enfin par définition, ce projet, qui vise à analyser le développement de neurones faisant partie d'un réseau complexe ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus et le Remplacement animal n'est pas possible.

14216 Les champs électromagnétiques de type radiofréquences (RF) représentent de nos jours l'agent physique le plus omniprésent dans notre environnement professionnel et privé. La recherche sur les effets biologiques et sur la santé dus à l'exposition aux RF a été très active au cours des deux dernières décennies, en raison des préoccupations relatives aux effets potentiels sur la santé des systèmes de communication sans fil. Deux types d'effets biologiques induits par les RF ont été pris en compte: thermique et non thermique. Les premiers, qui jouent un rôle important en cas d'exposition à des RF de haut niveau, sont bien établis et bien compris, tandis que les derniers sont encore controversés.

La proximité étroite entre le téléphone mobile et le cerveau de l'utilisateur fait de toute évidence du système nerveux central (SNC) une cible potentielle d'exposition aux RF. A ce jour, les effets publiés montrent une diminution réversible de l'activité électrique de neurones en cultures ou des modifications de l'électroencéphalogramme, pendant et/ou après une exposition à des RF. De telles

observations suggèrent fortement une utilisation potentielle de la radiofréquence pour modifier l'activité cérébrale mais doivent être évaluées expérimentalement *in vivo*.

Dans ce contexte, la surveillance en temps réel du fonctionnement du cerveau sous exposition aux RF doit encore être explorée. Dans ce projet, nous allons implémenter une nouvelle technique d'imagerie pour explorer en temps réel l'activité cérébrale de petits animaux simultanément à l'exposition aux RF. Grâce à la technique d'échographie par ultrasons ultra-rapides permettant d'obtenir des paramètres semblables à ceux révélés par l'IRM, ce projet fournira un outil permettant de déterminer rapidement si l'exposition à des champs RF affecte l'activité cérébrale à travers le débit sanguin.

Pour ce projet exploratoire, le nombre de souris DBA/2JRj mâles est estimé à 12 sur 1 an et les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- Réduire : Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux qui nous permet de réaliser l'étude de faisabilité. Deux souris supplémentaires sont prévues en cas de mort naturelle prématurée. L'analyse statistique utilisée est le test de Kruskal-Wallis. Chaque souris est également son propre contrôle (mesure avant, pendant et après exposition aux RF).
- Raffiner : Les souris sont placées dans une cage en plexiglass (540 cm² au sol), avec 4 souris au maximum par cage. Elles bénéficient d'un enrichissement avec une hutte en polycarbonate (rouge), en alternance avec des cabanes en carton, ainsi que du matériel de nidification. Les conditions d'hébergement sont de 21±2°C, 55±5% d'humidité et un cycle jour-nuit (8 heures-20 heures). Une surveillance quotidienne est assurée par le personnel de l'équipe.
- Remplacer : Remplacer le modèle animal n'est pas possible pour ce projet qui étudie des processus dynamiques dans le cerveau en particulier.

14217 L'adénocarcinome pancréatique (ADKP) est la forme la courante de cancer pancréatique, elle représente actuellement la quatrième cause de mort par cancer. Ce cancer extrêmement agressif est de mauvais pronostic avec un taux de survie étant actuellement de 5%, 3 ans après le diagnostic. Ce cancer est associé avec des mécanismes d'immunosurveillance inefficaces ainsi que l'accumulation dans le pancréas des populations immunitaires immunosuppressives. L'identification des candidats conjointement surexprimés dans le cancer pancréatique et impliqués dans l'immunosuppression pourrait donc fournir de nouvelles cibles de dépistage précoce pour les patients. Une surexpression de la protéine Big-h3 a pu être identifier dans des modèles murins de cancer pancréatique ainsi que chez l'homme.

Nous souhaitons étudier la biodistribution d'un anticorps spécifique radiomarké ciblant la protéine Big-h3 dans des modèles précliniques de cancers pancréatiques.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 120 souris C57Bl/6 sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont on permet de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle thérapie. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles.

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

14218 Le développement de certains composés pharmaceutiques requiert des explorations *in vivo* chez l'animal, à part des études réglementaires à proprement parler. Ces études peuvent être

demandées ou non par les autorités réglementaires, pour affiner ou mettre en place des conditions expérimentales, ou pour répondre à des questions de sécurité, ou pour explorer les mécanismes d'action. Ces études peuvent donc servir à affiner les expériences en amont des études réglementaires qui devront être réalisées par la suite, en permettant de limiter le nombre global d'animaux utilisés dans le développement d'un produit. Elles peuvent aussi directement contribuer à assurer la sécurité non-clinique des médicaments en comprenant mieux leurs mécanismes. Pour répondre à ces questions il n'existe à ce jour pas de méthode alternative *in vitro*, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

Selon les homologues avec l'homme, le primate non humain peut être la seule espèce appropriée pour ces essais. Dans tous les cas, l'usage du primate est raisonné, avec l'ambition d'atteindre les objectifs avec un nombre d'animaux minimal mais suffisant. Lorsqu'elles sont réalisées avant le démarrage d'études réglementaires avec des conditions particulières (voie d'administration ou investigations particulières), ces études avec peu d'animaux permettent d'assurer le succès des expérimentations requises par les autorités et qui nécessitent des nombres plus importants d'animaux, en évitant ainsi le risque de devoir les répéter.

En général ces études consistent en l'administration d'un produit pharmaceutique chez le macaque crabier ou le macaque rhesus. La fréquence et la durée d'administration sont variables en fonction des composés à tester, de l'objectif de l'étude, et de l'application chez l'homme. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme (orale, application dermale, intraveineuse, intra articulaire, etc.). Lorsqu'il s'agit de valider des techniques particulières, un soluté physiologique ou un produit de référence peuvent être utilisés au lieu d'un composé pharmaceutique à tester.

Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet est très variable selon le protocole expérimental. Il est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes et ainsi d'atteindre tous les objectifs spécifiques de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé. Il est attendu d'utiliser au maximum 320 macaques crabiers et 72 macaques rhesus sur les 5 ans de la durée du projet. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire ou intra vitrée par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés dans la mesure du possible en groupe dans des cages conformes à la Directive 2010/63. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, perchoirs, musique).

14219 Les ampoules LEDs que nous utilisons quotidiennement (éclairage, écran.) présentent une toxicité importante chez le rat. Il a été suggéré que cette toxicité pourrait être due à la présence d'un pic d'émission dans la lumière bleue. Alors que ces résultats soulèvent la question de leur toxicité chez l'homme, le rat présente l'inconvénient d'être un animal nocturne qui possède une rétine (tissu à l'origine de la vision) particulièrement sensible à la lumière. L'utilisation de la gerbille devrait permettre d'évaluer les atteintes des cellules photoréceptrices à cônes responsables de la vision des détails et des couleurs chez l'homme (vision diurne). En effet, la gerbille présente l'avantage d'avoir une rétine riche en cellules photoréceptrices à cônes (cellules responsable de la vision diurne) et une zone macula-like (la macula étant chez l'homme une zone riche en cellules à cônes, responsable de la vision diurne). Par conséquent, la gerbille apparaît comme un excellent modèle d'étude des lésions rétinienne induites par la lumière. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre d'animaux sera limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs : des techniques non invasives (électrorétinographies) seront réalisées avant de faire les prélèvements des tissus oculaires pour les analyses biochimiques, et immunohistochimiques de manière à obtenir le maximum de données sur un même animal et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'élevage où l'environnement est contrôlé. Les protocoles expérimentaux sont établis avec rigueur et les

animaux sont surveillés sur toute la durée des protocoles au quotidien. Le remplacement des expérimentations *in-vivo* par des modèles *in vitro* ou *in-silico* n'est pas envisageable dans le cadre de ce projet. Afin de mener à bien ce projet, nous utiliserons 252 gerbilles.

14220 Le cancer est désormais la première cause de mortalité dans les pays développés, devant les pathologies cardiovasculaires. Dans ce contexte, l'objectif de nos recherches est le développement de nouveaux agents thérapeutiques (tels que des agents de chimiothérapie ou des agents comportant des atomes radioactifs) :

- Afin d'améliorer la réponse des cancers aux traitements anti-cancéreux.
- Permettre d'adapter les traitements de façon la plus individualisée possible à chaque patient grâce à un examen indolore d'imagerie médicale.

Pour cela nous utiliserons des modèles expérimentaux les plus prédictifs possible afin de mimer les pathologies humaines. Chez des souris ou des rats, des cellules cancéreuses seront greffées sous la peau, ou directement dans la glande mammaire pour mieux simuler l'environnement originel du cancer. Ces opérations sont réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires sous anesthésie avec analgésie appropriée.

Les animaux seront ensuite traités avec les nouveaux agents thérapeutiques. Les animaux seront suivis individuellement pendant toute la durée de l'étude et seront euthanasiés s'ils présentent des signes de souffrance.

Au cours de nos travaux, des études de pharmacocinétique/pharmacodynamie seront réalisées. Ces études comporteront dans la majorité des cas 3 expériences distinctes :

- Une expérience pour évaluer l'activité anti-tumorale du nouvel agent.
- Une expérience pour évaluer la distribution du nouvel agent dans les tissus au cours du temps. Cette distribution pourra être évaluée par imagerie SPECT ou TEP.
- Une expérience pour évaluer la biodistribution de l'agent thérapeutique et la recherche de marqueurs biologiques d'efficacité antitumorale.

Environ 5 études sont réalisées chaque année, pour une utilisation de 650 animaux par an et 3250 sur 5 ans.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude « classique » qui nécessite l'euthanasie des animaux à chaque point de temps examiné pour l'évaluation de la distribution dans les tissus, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps chez le même animal et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. L'étude préalable des molécules d'intérêt sur culture cellulaire permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (greffe des cellules tumorales, injection sous-cutanée, intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie ; avec antalgie appropriée si nécessaire ; et chaque procédure est suivie d'un réveil sous lampe chauffante afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

14221 Les maladies parasitaires liées aux vers parasites touchent aussi bien l'Homme que les animaux. L'impact de ces vers parasites sur la santé animale est significatif puisqu'ils sont responsables de symptômes cliniques de type perte de poids, anémie, diarrhée voire la mort des animaux les plus atteints. L'utilisation massive de vermifuges a conduit à l'apparition de vers résistants aux traitements et rend actuellement le contrôle de ces parasites relativement limité pour l'élevage moderne conventionnel. Quant à l'agriculture biologique, elle favorise la mise en place de mesures de prévention et proscrit en préventif l'utilisation de médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse. Que ce soit dans l'un ou l'autre de ces systèmes de production, la santé des animaux peut être mise à mal par les parasites entraînant un mal-être important voire une souffrance dans les cas les plus extrêmes. Il est donc urgent de trouver de nouvelles solutions de contrôle efficaces, plus naturelles et respectueuses de l'environnement.

Pour cela, nous développons des projets de recherche qui visent à mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de vers résistants mais également l'effet antiparasitaire de produits naturels. Au laboratoire, le modèle ovin est couramment étudié mais dans l'optique de tester de nouvelles molécules aux propriétés antiparasitaires, le modèle murin est très pertinent. En effet, après des tests *in vitro* de première intention (mise en évidence de produits actifs sur les stades libres du parasite) les preuves de concept peuvent être menées *in vivo* sur souris et ceci de manière beaucoup plus aisée que si l'on travaillait sur ovins (infrastructures, quantités de produits naturels à tester, approvisionnement en animaux, coût.). Nous avons donc mis au point un modèle murin sur lequel nous pouvons inoculer un nématode gastro-intestinal, *Heligmosomoïdes polygyrus bakeri*, phylogénétiquement proche des parasites ovins. Dans un second temps, les résultats pourront être généralisés à l'ensemble des trichostrongles avec un retour sur les espèces cibles.

Actuellement, les microalgues sont sujettes à un fort engouement en nutrition et santé humaine, par leur richesse en nutriments et l'effet avéré de certaines molécules sur la protection de l'organisme : activités anti-oxydante, anti-microbienne, anti-virale, anti-parasitaire... Cet intérêt pour leur potentiel touche depuis peu le secteur de la nutrition animale. De plus, les effets bénéfiques de certains composés des microalgues sur la santé des organismes peuvent également constituer une alternative à l'utilisation des traitements médicamenteux en élevage. Cependant, les effets de l'introduction des microalgues dans la ration sur les performances et la santé des animaux d'élevage sont peu connus.

En première intention, une série de tests *in vitro* a permis de mettre en évidence une activité antiparasitaire de plusieurs extraits de ces microalgues. Le protocole proposé ici est une étude préliminaire qui vise à choisir le meilleur candidat parmi 3 extraits sélectionnés *in vitro* en servant de preuve de concept (rechercher si les extraits interagissent avec la cible souhaitée et s'ils agissent sur l'affection concernée).

Deux critères seront évalués : - Effet sur les performances zootechniques (croissance des animaux dans un contexte infectieux) - Effet sur la sensibilité à un pathogène (niveau de contamination : nombre d'œufs de parasite excrété dans les fèces au cours du temps et/ou nombre de vers hébergés par la souris). Les effets seront étudiés par comparaison à un groupe recevant un aliment standard pour souris également soumis à l'infestation par le parasite.

Dans ce projet nous utiliserons des souris C57BL/6J mâles âgées de 4 semaines. Nous envisageons d'utiliser un total de 50 souris C57BL/6J pour cette expérience. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs avec les tests statistiques utilisés.

Remplacement : le ver parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri* est un parasite obligatoire dont le cycle de développement ne peut être réalisé *in vitro*.

Réduction : afin de minimiser au maximum les nombres d'animaux nécessaire, une série de tests *in vitro* a permis de sélectionner les extraits de microalgues les plus prometteurs (3 parmi 30 candidats), d'autre part la mise au point du modèle murin permet de limiter le recours aux ovins (les 2 parasites étant phylogénétiquement très proche)

Raffinement : les souris (5 par cage) sont hébergées en portoirs ventilées dans des cages contenant du sopalin pour enrichir le milieu (leur permettant de réaliser un nid). Elles seront suivies sur une base quotidienne. Si nous constatons des signes d'inconfort liés au traitement (trouble du comportement, perte de poids supérieure à 20%), les souris concernées seront immédiatement sorties de l'expérience.

14222 La réparation tissulaire est requise après différents traumatismes comme un choc, une blessure ou encore une ischémie (diminution de l'apport en oxygène et en nutriments). Une étape importante pour cette réparation est l'angiogenèse qui contribue à rétablir une perfusion sanguine adéquate dans le tissu. Les stratégies thérapeutiques sont limitées par le fait que l'on ne connaisse pas encore bien l'ensemble des mécanismes concourant à la formation d'un nouveau vaisseau fonctionnel. Nous nous intéressons au rôle des morphogènes dans ce processus et en particulier à ceux de la

famille Hedgehog. Il a en particulier été suggéré que l'administration thérapeutique de Sonic Hedgehog (Shh) favorisait l'angiogenèse et la maturation des vaisseaux. Ce projet a pour objectif de mieux comprendre le mécanisme d'action de Shh en caractérisant notamment le rôle de plusieurs acteurs moléculaires de la voie de signalisation Hedgehog (Dhh, Smo, Gli3, Gas1 et Cdon) dans l'angiogenèse.

Dans cet objectif nous induirons l'angiogenèse dans la cornée, (qui est normalement avasculaire) par l'implantation d'un mirco-pellet contenant de la protéine recombinante Shh ou VEGF (vascular endothelial growth factor) chez des souris déficientes ou non pour Dhh, Smo, Gli3, Gas1 et Cdon. Dans ce modèle, l'angiogenèse et la maturation des nouveaux vaisseaux seront mis en évidence par immunomarquage des cellules vasculaires et de cellules inflammatoires.

Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 612 souris. Pour réduire le nombre d'animaux, aucune expérience déjà publiée ne sera reproduite et lorsque cela sera possible, les études conceptuelles seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture avant d'être testée *in vivo*. Cependant l'angiogenèse est un processus complexe mettant en jeu des interactions entre de nombreux types cellulaires locaux et circulants qui ne peuvent pas être reproduites *in vitro*. Suite à notre expérience concernant ce modèle (15 ans, cette saisine fait notamment suite à une saisine précédemment acceptée par le CEEA50), 5 animaux par groupe (soit 10 cornées) sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. La souffrance des animaux est réduite par l'usage d'anesthésiques et d'antalgiques adaptés pour la réalisation des gestes douloureux et en post opératoire.

14223 L'athérosclérose est une maladie inflammatoire systémique, chronique et progressive qui est caractérisée par l'accumulation de plaques riches en lipides dans les parois des artères. L'athérosclérose crée les conditions pathologiques de l'infarctus du myocarde, l'angine de poitrine, l'accident vasculaire cérébrale et les maladies vasculaires périphériques. Il y a donc un besoin crucial de détecter la présence, chez les patients, de lésions à haut risque de rupture (plaques instables) entraînant des troubles cardio-vasculaires irréversibles. Mais la majorité de ces lésions instables n'induisent pas de symptômes cliniques. D'où un intérêt croissant pour le développement d'outils de diagnostic afin d'évaluer les composants cellulaires ou tissulaires qui sous-tendent le risque de rupture. Notre étude porte sur le théranostic de l'athérosclérose, à savoir offrir la possibilité d'effectuer une imagerie non invasive par résonance magnétique (IRM) pour établir le diagnostic et d'administrer un médicament au niveau du site d'intérêt pour le traitement. Ces outils de diagnostic seront développés à partir d'anticorps humains afin de minimiser les réactions d'allergie lors de l'injection chez l'homme. L'IRM est une modalité d'imagerie « sans risques » qui offre la possibilité d'utiliser des agents de contraste sûrs. Il est cependant nécessaire de tester ces outils de diagnostic dans des études pré-cliniques. Ces études sont réalisées sur deux modèles animaux d'athérosclérose et un modèle témoin « sain ». En effet, afin de nous permettre de répondre aux questions cliniques, des modèles animaux de la pathologie sont nécessaires afin d'avoir une représentation complète de la physiologie du corps entier. Des analyses sur les tissus de ces groupes seront également effectuées afin de valider nos études.

Afin de réduire, le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixés une limite maximale de 460 souris au total. Il s'agit, de par notre expérience du nombre minimal d'animaux nécessaire pour l'obtention de données statistiquement exploitables. Les données issues des premières conclusions expérimentales de chaque groupe permettront de réduire au minimum le nombre d'animaux sans compromettre les objectifs expérimentaux des projets.

En accord avec la règle des 3 R, l'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement. Les animaux seront hébergés en cages collectives afin de maintenir les interactions sociales, enrichies en nid végétal, coton, maisonnette, tubes en carton, bois à rongé, de la nourriture et de l'eau à volonté, afin de satisfaire au mieux leur bien-être. Des points limites et des critères d'arrêts seront définis. Ainsi au cours des procédures, une prise en charge de la douleur et du stress sera mise en place pour soulager au maximum l'inconfort des animaux. Aucun animal ne sera laissé sans soin.

14224 L'épilepsie recouvre plusieurs maladies neurologiques ayant pour point commun la répétition de crises épileptiques spontanées. Ces crises sont liées à une activité électrique anormale des cellules du système nerveux central. En France, environ 500000 personnes sont touchées par une épilepsie qui peut débuter à tous les âges de la vie. L'épilepsie souffre d'une image péjorative dans la société, liée en partie à une méconnaissance de la maladie. Bien que les traitements pharmacologiques soient efficaces sur certains patients, on estime à 30% la proportion de patients épileptiques réfractaires aux médicaments. Chez ces patients pharmaco-résistants, il existe un risque élevé de mort soudaine liée à l'épilepsie, caractérisée par un arrêt des fonctions cardiaque et respiratoire. Les causes de cette mort soudaine sont encore mal comprises et il n'existe aucune méthode pour lutter contre cette mortalité. Notre hypothèse de travail est que la neurostimulation vagale pourrait être utilisée efficacement pour contrecarrer l'arrêt cardio-respiratoire lié à l'épilepsie. Afin de tester cette hypothèse, il est nécessaire de disposer d'un modèle animal reproduisant la mort soudaine liée à l'épilepsie.

Le présent projet vise à réaliser un élevage de souris déficientes en canaux potassique de type Kv1. 1 (souris KO Kv1. 1) et à maintenir cette lignée. Ces souris génétiquement modifiées constituent un modèle expérimental reconnu de mort soudaine liée à l'épilepsie. Seules les souris homozygotes (Kv1. 1-/-) développent des crises d'épilepsie spontanées vers l'âge de 5 semaines, associées à une mortalité d'environ 50% au même âge. Cependant, il est prévu que toutes les procédures expérimentales (depuis l'élevage jusqu'aux expériences en laboratoire) se déroulent avant l'apparition du phénotype dommageable, soit à la 4ème semaine post-natale.

Le plan d'élevage proposé est le suivant: 1 mâle hétérozygote sera hébergé avec 1 femelle hétérozygote. L'index de prolificité moyen est de 6 souris avec un rapport mâle-femelle de 1:1. Afin de respecter les règles éthiques, nous appliquerons la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum grâce à une feuille de calcul fournie en annexe. Le nombre de souris nécessaire pour l'élevage et le maintien de la lignée KO Kv1. 1 est estimé à 224 pour l'ensemble du projet. Les animaux seront observés quotidiennement et une attention particulière sera accordée aux procédures de raffinement. Les souris disposeront de nids végétaux à base de fibres courtes de coton (neslets), utilisés comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de stimuler l'activité, de procurer un sentiment de sécurité et de réduire le stress chez l'animal.

14225 Pour améliorer la durabilité de la production aquacole d'espèces carnivores, il faut réduire la part de farine de poisson, issue des pêches minotières, dans les aliments. L'augmentation de la part de sucres digestibles dans l'aliment semble être une bonne option tant d'un point de vue économique qu'environnemental. Toutefois, la truite est considérée comme un carnivore strict, utilisant comme source d'énergie les protéines alimentaires et faiblement adaptée à l'utilisation des sucres. Ce type de substitution fait l'objet de nombreuses études chez des animaux en croissance, la nutrition des géniteurs ayant été mise de côté depuis 30 ans. En effet, la reproduction des salmonidés répondant aux attentes des éleveurs en termes de quantité et de qualité, les formules des aliments dédiés à ces animaux n'ont jamais fait l'objet de modifications. Ces aliments ne sont plus adaptés aux besoins précis de ces reproducteurs ni aux enjeux sociétaux et environnementaux actuels. En effet, ces poissons, de par leur poids important requis par leur fonction de reproducteurs, consomment les aliments en quantité non négligeable. Aussi, remplacer une partie de la farine de poisson par des sucres permettrait de diminuer le coût de l'aliment ainsi que les rejets azotés en épargnant les protéines pour la croissance. Des études des années 90 sur la physiologie des reproducteurs semblent montrer que la production des ovules et des spermatozoïdes requiert une mobilisation en sucres chez les salmonidés. En l'absence d'apport en sucre par l'alimentation, ceux-ci sont produits par l'animal à partir des protéines ce qui demande une forte mobilisation énergétique. Ces études montrent qu'en période de reproduction l'augmentation des sucres dans l'alimentation des salmonidés semble être mieux acceptée par l'animal sur de longues périodes qui les utilise pour sa production d'ovules.

Pour réviser les recommandations nutritionnelles pour les géniteurs de truites afin qu'elles répondent mieux aux besoins physiologiques des animaux et aux enjeux environnementaux

actuels, nous avons récemment mené une étude à fort taux de sucres chez des femelles et des mâles très concluante en terme d'acceptation d'une telle nourriture et de conséquences positives sur la descendance de ces géniteurs. Cependant, en élevage salmonicole, l'intérêt est d'obtenir une descendance uniquement de sexe femelle. En effet, la commercialisation au stade dit « portion » pour la chair requiert que les animaux ne soient pas matures sexuellement pour ne pas affecter la qualité de la chair, ce qui est le cas des femelles mais pas des mâles dont la maturation sexuelle est plus précoce. Afin d'obtenir uniquement des descendants femelles, les pisciculteurs utilisent en routine des néomâles, c'est-à-dire des animaux produisant des spermatozoïdes ne pouvant donner que des descendants femelles. Ces géniteurs ont une physiologie différente de celle des femelles et des mâles. Ainsi, nous nous proposons de nourrir ces animaux très précieux en élevage avec un aliment riche en sucres (25%) ou sans sucres et de suivre l'utilisation de ceux-ci au cours du cycle reproducteur et les conséquences sur les performances de reproduction et la robustesse des alevins issus de ces reproducteurs. L'analyse des voies métaboliques liées à l'utilisation des sucres et des paramètres zootechniques sera menée à 5 étapes clés du cycle de reproduction correspondant au développement des spermatozoïdes. A chaque étape, 8 néomâles seront prélevés par régime (régime riche en sucres et régime contrôle sans sucres) soit 80 animaux euthanasiés. Afin de respecter une densité optimale pour limiter les comportements agressifs, 20 néomâles (soit 40 en tout) seront ajoutés par bassin et remis en élevage après l'expérience faisant un total de 120 (80 euthanasiés + 40 remis en élevage). Les néomâles seront reproduits pour évaluer les performances de reproduction en croisant les parents ayant reçu les différents régimes. Pour la reproduction, 10 femelles par aliment (soit 20 animaux en tout) seront aussi nourries durant un cycle reproducteur entier afin d'assurer la fourniture en ovules. Les alevins seront étudiés avant le premier repas en termes de malformations et de mortalités. Cette expérience étant longue, nous souhaitons aussi adjoindre 10 mâles par aliment (soit 20 animaux) à cette expérience afin d'évaluer de nouveau l'effet de l'aliment riche en sucres sur la descendance. Ceci a été étudié dans une précédente expérience, cependant afin de confirmer la possibilité de mettre en place ce type de nutrition en routine en élevage, il faut s'assurer de la répétabilité des effets positifs observés. En effet, d'une année sur l'autre, des facteurs environnementaux peuvent modifier l'effet de la nutrition des parents sur les descendants. Les mâles et les femelles seront mis dans des bassins communs (1 par aliment). Enfin, aux 10 femelles et 10 mâles contenus dans chaque bassin, 20 individus de chaque sexe (mâles et femelles) seront ajoutés par bassin afin de respecter une densité optimale pour limiter les comportements agressifs. Les deux bassins comportant les mâles et les femelles contiendront donc chacun 30 femelles et 30 mâles (soit au total 120 animaux en expérimentation). Les mâles et les femelles ne seront pas abattus et remis dans l'élevage pour les reproductions commerciales.

Total: néomâles = 120 (80 euthanasiés), femelles = 60, mâles = 60, soit en tout 240 animaux

Remplacement: les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme des sucres et meilleure utilisation des sucres alimentaires, qualité des reproductions) ne peuvent être observés que sur des espèces carnivores comme la truite. Raffinement : aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants, les animaux bénéficieront d'un enrichissement du milieu par la mise en place de plaques d'ombrage leur permettant de se cacher. Réduction : le nombre de poissons prélevés (mise à mort par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant) est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures. De plus, l'ensemble de l'animal, y compris la carcasse entière, sera analysé. Les femelles et les mâles utilisés pour la reproduction seront remis en élevage pour les reproductions commerciales suivantes.

14226 L'usage du ballon intragastrique est homologué dans certains cas de surcharge pondérale ou d'obésité. Ces dispositifs peuvent être posés sur une durée allant de 3 à 12 mois pour favoriser une perte de poids du fait d'un encombrement de l'estomac et de l'émission de signaux de distension gastrique qui jouent un rôle dans le rassasiement. L'usage du ballon intragastrique nécessite obligatoirement une endoscopie lors de la pose et une autre lors du retrait. Il existe un certain nombre de contre-indications ou de complications liées au ballon intragastrique, son efficacité ne fait pas consensus, et elle reste de toutes façons de courte durée. Des recherches sont menées

pour proposer des alternatives au ballon intragastrique. Notre étude vise à évaluer, chez le modèle miniporc obèse, la sécurité biologique, la performance et l'efficacité d'un tel dispositif ingestible. Il s'agit d'une solution liquide ingestible formant un gel visqueux et radio-opaque dans l'estomac, qu'il est ensuite possible de dissoudre à volonté et de manière non invasive en buvant une solution tampon. Vingt-quatre miniporcs Yucatan adultes femelles seront soumis durant 8 semaines à un régime hypercalorique enrichi en sucres et en lipides pour induire une obésité, avant de recevoir le dispositif ingestible à tester ou un traitement contrôle. Des images anatomiques (scanner X) seront acquises à différents temps après ingestion pour suivre la dynamique de formation des gels dans l'estomac. Dix-huit animaux seront suivis durant 16 semaines, et six seront suivis jusqu'à 52 semaines. Durant toute la durée expérimentale, les refus alimentaires seront calculés quotidiennement. Le poids corporel et la circonférence abdominale seront mesurés toutes les deux semaines. Une prise de sang sera réalisée mensuellement le matin à jeun pour analyses ultérieures (cholestérol, triglycérides, insuline, ghréline, etc.). Tant que des prises de sang simples en veine jugulaire seront possibles, nous privilégierons cette approche. Si ces prises de sang deviennent compliquées ou inconfortables pour les animaux, nous procéderons à l'implantation d'une chambre sous-cutanée de prélèvement veineux. En fin d'expérimentation (semaine 16 ou 52 selon les animaux), nous ferons ingérer aux animaux une solution tampon permettant de dissoudre le gel formé dans l'estomac et de l'évacuer par les voies naturelles. La cinétique de dissolution du gel sera suivie par imagerie. Le sacrifice des animaux interviendra en semaine 16 ou 52 selon les groupes. Une étude anatomopathologique macroscopique sera réalisée sur divers organes (tractus digestif, foie, pancréas), et une étude microscopique sera réalisée sur l'œsophage et l'estomac. REMPLACEMENT : L'utilisation d'un modèle animal proche de l'Homme est nécessaire pour valider l'usage du dispositif avant son implémentation dans un protocole clinique chez l'Homme. Aucune simulation *in silico* n'est possible et l'utilisation d'un modèle *in vitro* de type « estomac artificiel » ne permettrait pas d'estimer le comportement du dispositif ingestible dans l'estomac véritable d'un animal durant plusieurs semaines ou mois. REDUCTION : Les effectifs animaux utilisés pour cette étude correspondent à un minimum raisonnable pour bénéficier d'une puissance statistique appropriée aux mesures réalisées. RAFFINEMENT : Les approches d'imagerie et de prélèvement ont été choisies et optimisées de manière à être le moins invasif possible (e. g. imagerie *in vivo* sur animaux anesthésiés et chambres de prélèvement).

14227 Durant l'hiver, les vaches laitières sont souvent alimentées avec un mélange d'ensilage de maïs et de divers aliments concentrés (céréales, tourteaux) et co-produits (pulpes, drèches), distribués séparément ou en mélange.

D'une façon générale, avant la distribution, les fourrages sont conservés séparément des aliments concentrés. En ration dite "complète", tous les ingrédients sont mélangés le jour même de la distribution, le mélange d'aliments étant ensuite distribué aux animaux en un ou plusieurs repas par jour. Cette étude a pour objectif de comparer deux traitements : 1) un régime témoin où les aliments sont mélangés le jour même de leur distribution, et 2) un régime expérimental où les mêmes aliments sont mélangés dans un silo un mois avant leur distribution, soit un mois avant le début de l'essai. La production et la composition de lait, la quantité ingérée et la production de méthane seront mesurés afin de déterminer l'efficacité d'utilisation de la ration, notamment au plan digestif. Cet essai d'alimentation sera mené pendant une durée de 3 mois sur 22 vaches laitières en production, dans des conditions représentatives de celles rencontrées dans les élevages commerciaux. Durant tout l'essai, deux lots homogènes de 11 vaches recevront chacun un des deux régimes alimentaires. La règle des 3R a été bien prise en compte. Remplacer : cette étude ne peut être réalisée que sur des vaches adultes en production, car la réponse animale intègre les processus digestifs et métaboliques, notamment pour la production de lait et de méthane. Réduire : le nombre de vaches utilisées est réduit le plus possible, car un minimum est nécessaire pour mettre en évidence des potentiels effets significatifs des régimes alimentaires (puissance statistique suffisante). Raffiner : une attention particulière sera portée sur le bien-être des animaux (contrôle de l'ingestion, état de santé général), et toute indication de mal-être des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire.

14228 L'épilepsie est une pathologie neurologique commune se caractérisant par des crises épileptiques récurrentes. Bien que de nombreuses molécules antiépileptiques aient été développées, un tiers des patients ne répondent pas au traitement. Il y a donc un besoin urgent d'identifier de nouvelles cibles et/ou de nouvelles molécules thérapeutiques.

Nous distinguerons dans notre projet deux mécanismes : l'épileptogénèse et l'ictogénèse. L'épileptogénèse regroupe l'ensemble des processus conduisant un système neuronal normal à devenir épileptique, c'est-à-dire capable de générer des activités épileptiques ou crises de façon soudaine et imprévisible. L'ictogénèse recouvre l'ensemble des processus déclenchant une activité épileptique ou crise. Nous étudions la régulation de gènes (organisés en réseau) contrôlant ces mécanismes. Des travaux préliminaires ont permis de sélectionner deux molécules candidates pouvant avoir une action sur la pathologie. Il s'agit de l'acide valproïque (VPA), déjà utilisé comme antiépileptique, et la withaferin A (WFA).

Nous souhaitons analyser l'effet de ces deux molécules sur les manifestations pathologiques présentes dans un modèle animal d'une forme d'épilepsie particulière, l'épilepsie du lobe temporal. Ce modèle est bien établi et couramment utilisé dans la littérature. Il s'agit d'induire chez un jeune rat un état de mal épileptique par injection d'un antagoniste des récepteurs glutamatergiques muscariniques (pilocarpine) et d'un thymorégulateur (lithium). Un mois après cette procédure, le rat développera des crises d'épilepsies spontanées. Celles-ci se caractérisent au niveau comportemental par des convulsions et au niveau cérébral par des signaux électroencéphalographiques (EEG) semblables à ceux observables chez le patient atteint d'épilepsie du lobe temporal. Ainsi, nous évaluerons l'effet des deux molécules sur la mise en place de l'état épileptique et la récurrence des crises (effet antiépileptogénique) et/ou la crise épileptique en elle-même, se manifestant par des convulsions (effet anticonvulsivant/ anti-ictogénique) via les enregistrements EEG. L'effet sur le niveau d'expression des gènes se fera via l'analyse transcriptomique (séquençage à très haut débit des ARN messagers) sur les tissus prélevés sur les cerveaux (hippocampes) à l'issue de l'expérimentation *in vivo*.

Ce projet a été pensé en accord avec la règle des 3R :

1) REMPLACER : Si des réseaux de gènes associés à l'épilepsie ont pu être identifiés *in silico*, il n'est actuellement pas possible d'étudier l'effet de nos molécules candidates *in silico*. Il n'existe pas non plus de modèle *in vitro* permettant d'étudier à la fois les effets comportementaux (convulsions et crises d'épilepsie) et sur le contrôle de l'expression des gènes d'intérêt d'un traitement.

2) REDUIRE : Le nombre d'animaux estimé tient compte à la fois du principe de réduction, de notre expérience pour ce type d'étude, et des prérequis nécessaires pour obtenir des réponses scientifiquement et statistiquement rigoureuses aux questions posées. Ainsi, nous prévoyons d'utiliser au maximum, un total de 120 animaux pour ce projet. La répartition est la suivante : 60 animaux seront utilisés pour évaluer l'effet anti-épileptogène et 60 autres pour l'effet anti-ictogène, avec à chaque fois, 20 animaux contrôlent (injection de solution saline) et 40 animaux traités (20 recevant le VPA et 20 autres la WFA) ; soit 6 groupes au total. Cependant la réalisation séquentielle de l'analyse des deux effets pourra nous amener à réduire au besoin ce nombre total.

3) RAFFINER : Nous avons pris en compte le bien-être de l'animal lors de la conception de ce projet. Ainsi, nos animaux seront hébergés en groupe dans un milieu enrichi ce qui minimisera leur stress. Nous avons défini des points limites évaluant leur bien-être et qui en cas de besoin, conduiront à l'arrêt des procédures. Le design séquentiel de ce projet nous permettra, par des analyses intermédiaires, de prendre les dispositions nécessaires pour maintenir le bien-être de nos animaux. Ce projet nécessite un certain nombre de contraintes pouvant conduire à un mal être ou une souffrance (état de mal épileptique ou pose d'électrode d'enregistrement EEG par chirurgie par exemple) qui ne peuvent être contournés. Nous les avons cependant pensés de façon à réduire la souffrance des animaux (utilisation d'antalgiques et d'anesthésiques).

Cette demande de projet, d'une durée de 3 ans, recouvre :

- L'induction de l'état de mal épileptique chez le rat (modèle lithium-pilocarpine)
- L'injection des molécules candidates

- L'implantation d'électrodes pour l'enregistrement des signaux EEG lors des crises.

14229 Les personnes travaillant avec des animaux de laboratoire doivent maîtriser des gestes techniques plus ou moins complexes : administrations, prélèvements, chirurgies, Leur formation initiale doit parfois être complétée par une formation spécifique, en fonction des études qu'ils seront amenés à faire et de l'évolution des connaissances et des pratiques.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 4100 animaux (1000 souris, 2500 rats, 50 gerbilles, 50 hamsters, 250 cobayes et 250 lapins) sur une durée de 5 ans. Dans la très grande majorité des cas, il s'agira d'animaux sortant d'une étude (animaux réutilisés).

La personne en formation sera systématiquement accompagnée par une personne experte dont la maîtrise est reconnue pour le geste. La formation se divisera en plusieurs étapes : formation théorique sans animaux, observation, réalisation sous une supervision directe, réalisation sous une supervision à distance.

Pour valider l'acquisition des gestes, la personne experte tiendra compte de critères de réussite et de critères de réalisation, définis pour chaque geste technique.

Remplacement : Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution, qui pourraient restituer fidèlement les comportements et réactions des animaux et/ou la manipulation des tissus vivants. Ces gestes étant très spécifiques de l'espèce, ils doivent être acquis chez l'espèce cible.

Réduction : Les animaux seront, majoritairement, issus d'études antérieures et utilisés pour plusieurs gestes techniques de ce projet.

Raffinement : Les animaux bénéficient d'un enrichissement social et physique dans la zone d'hébergement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une recherche systématique de points limites. Les procédures sont réalisées par du personnel déjà formé aux sciences et techniques des animaux de laboratoire, mais devant acquérir une expertise complémentaire. Ce personnel en formation sera toujours sous la supervision d'une personne experte.

14230 L'identification des régions du cerveau impliquées dans ce processus de mémorisation est d'un intérêt crucial pour mieux comprendre les pathologies liées aux problèmes de mémoire.

Jusqu'à présent, la croyance commune était que des fonctions spécifiques étaient codées dans des régions spécifiques. Il est maintenant clair que chaque action que nous réalisons est la conséquence d'une activation orchestrée de différentes régions du cerveau. En utilisant une nouvelle approche d'étude des réseaux, nous souhaitons définir la manière dont les différentes régions cérébrales communiquent entre elles lorsque l'on se remémore une mémoire spatiale ancienne.

L'introduction de nouvelles technologies permettant la visualisation *in vivo* et en temps réel de l'activité neuronale dans des régions spécifiques du cerveau a ouvert la possibilité de répondre à des questions non résolues. En particulier, il est maintenant possible de corréler la contribution en temps réel de cellules individuelles ou de sous-populations spécifiques de cellules dans une tâche comportementale particulière.

Dans ce projet, nous souhaitons identifier de nouvelles régions du cerveau impliquées dans la consolidation de la mémoire et à cibler des circuits neuronaux spécifiques dans le but d'étudier leur implication dans le rappel de la mémoire. Nous voulons également définir comment l'activité neuronale des cellules impliquées dans la codification de l'information spatiale évolue au cours de la consolidation de la mémoire. Pour cela, nous utiliserons (sur 5 ans) au total 688 souris (de lignée C57Bl6X129 et pour certaines expériences une lignée de souris génétiquement modifiée à phénotype non dommageable, seront utilisées dans ce projet. L'utilisation de 3 nouvelles techniques, la chimiogénétique, l'optogénétique et l'imagerie calcique, nous permettra de surveiller et de contrôler l'activité de population de neurones dans le thalamus, l'hippocampe et le néocortex de souris adultes lors du rappel de la mémoire spatiale chez la souris.

Le nombre d'animaux est limité au nombre minimal permettant de faire des études statistiques. De plus, de façon à réduire le nombre d'animaux inclus, ces souris seront utilisées dans de multiples tests. Le modèle et procédures ont été raffinées de façon à garantir un bien-être animal tout au long des expériences. En conformité avec la réglementation, une anesthésie et analgésie appropriées seront incluses dans les procédures chirurgicales ; les éléments aversifs seront ajustés pour générer un stress minimal. Les manifestations de stress en dehors des périodes d'apprentissage et de test seront évitées et particulièrement surveillées.

Du fait des approches intégratives de ce projet, l'utilisation d'animaux entiers restent incontournables et ne peuvent être effectués chez l'homme. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthodes substitutives *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico* pour obtenir des données sur ces processus cognitifs complexes. Le modèle rongeur est modèle idéal du fait de ses capacités mnésiques et cognitives, sa petite taille et l'existence de lignées génétiquement modifiées.

14231 Les synucléinopathies est le terme regroupant différentes maladies neurodégénératives humaines dont la maladie de Parkinson (MP), les démences à corps de Lewy et l'atrophie multisystémisée. La caractéristique commune de ces pathologies neurodégénératives est une accumulation anormale de la protéine α -synucléine sous une forme délétère dans les cellules du système nerveux central. L'accumulation de l' α -synucléine est impliquée dans la mort des neurones qui est observée dans certaines régions particulières du cerveau chez les patients atteints de ces maladies.

Nous avons développé un test sur cultures de neurones de souris exposés à de l' α -synucléine. Ce test vise à (i) reproduire *in vitro* les phénomènes initiateurs de la synucléinopathie associée à la MP et (ii) servir de base d'identification des points de contrôle possibles de cette pathologie.

La mise en oeuvre d'un tel test permet d'évaluer « en batterie » un grand nombre d'hypothèses mécanistiques ainsi que de composés, à une échelle irréalisable chez l'animal. Cependant, afin de valider la pertinence physiopathologique du test, il est tout d'abord nécessaire de déterminer si les phénomènes moléculaires élémentaires mesurés dans ce dernier ont effectivement lieu ou pas *in vivo*, au sein de régions exposées artificiellement à des agrégats de synucléine. Nous devons donc le faire *in vivo* chez des animaux à un âge proche de celui des cultures de neurones, c'est-à-dire à P0 chez lesquels des injections stéréotaxiques seront faites pour injectés des agrégats de synucléine. Pour ce faire, 6 portées de 8 nouveaux nés seront utilisées soit 48 animaux.

Dans le respect du R de réduire, ce nombre de souris est établi pour obtenir une puissance statistique suffisante lors de l'étude. Dans le respect du R de remplacer, la validation de notre hypothèse nous permettra d'utiliser pour un projet complexe, un modèle *in vitro* de culture de neurones. Une attention particulière pour le raffinement de nos procédures sera apportée pour limiter, soulager douleur et stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Des points limites suffisamment précoces seront utilisées pour éviter toute souffrance.

14232 Aujourd'hui l'aquaculture fournit 60% des poissons consommés dans le monde. Afin de préserver les ressources marines, la tendance actuelle est au remplacement de la farine et huile de poisson par des végétaux. Cependant, cette substitution altère considérablement la croissance, la reproduction et la survie des poissons et les mécanismes sont encore mal expliqués à ce jour. En raison du rôle des acides gras omega-3 sur le fonctionnement et le développement du cerveau, ces altérations pourraient être une conséquence de la suppression des farines et huiles de poissons et donc des oméga-3 dans les aliments des poissons. L'objectif de cette expérimentation est donc de comprendre les raisons de ces altérations des truites vis à vis de régimes végétaux et d'en proposer une alternative dans le respect de la durabilité. Pour cela, l'étude vise à étudier l'impact d'un régime marin, d'un régime 100% végétal (dépourvu en omega-3) et d'un régime 100% végétal + omega-3 (omega-3 DHA apporté un nouvel ingrédient qu'est l'huile d'algue marine) sur la croissance, la reproduction et l'effet sur la descendance chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). D'une part cette étude va permettre de comprendre les altérations physiologiques et cellulaires des truites vis-à-vis de régime végétal et d'autre part d'observer si l'apport en oméga-3 dans ce régime peut prévenir de ces altérations. Aussi, chez le mammifère, le cerveau et la langue sont deux organes

qui jouent un rôle primordial dans le contrôle de la prise alimentaire. Ainsi, les enjeux scientifiques de cette expérimentation auront pour but de déterminer les mécanismes de régulation de la prise alimentaire mis en jeu par ces régimes et ar les oméga-3. Pour cela, différentes études seront réalisées durant 30 mois. La première va s'intéresser à étudier l'impact des régimes sur la croissance et les mécanismes cellulaires sous-jacents sur des truites femelles nourries dès le premier repas et ce durant 12 mois. Dans la deuxième année, une partie de ces mêmes truites se verront nourrir avec les mêmes régimes jusqu'à leur première ponte (24 mois de l'animal). Il sera alors question d'étudier l'impact des régimes sur la première reproduction des truites femelles. Enfin la troisième étude sera consacrée à l'impact des régimes parentales (truites nourries durant 24 mois avec les 3 régimes) sur l'acceptation d'un régime 100% végétal sur leur descendance. Il sera alors question d'observer si la nutrition parentale peut influencer le comportement alimentaire des descendants. Durant l'expérimentation, les truites seront réparties dans des bassins de différentes tailles au fur et à mesure de leur croissance selon une densité de 100 alevins par bassin (18 bassins au total soit 1800 alevins pour l'étude 1/2) au début de l'expérience. Il en sera de même en nombre pour l'expérience 3 qui concerne la descendance (1800 alevins) de ces premiers poissons. Soit un total de 3600 alevins sur 30 mois. Dans le but de favoriser le bien-être et de minimiser le stress de l'animal, les études seront réalisées dans des conditions d'élevage dites classiques et optimisées: la température sera de 17°C (+/- 1°C), les animaux seront placés en bassins extérieurs et soumis à une photopériode naturelle, l'eau des bacs sera constamment renouvelée en eau de rivière (6 fois par heure). La charge en oxygène dans les bacs en fin d'expérimentation sera réglée à 3000 mg/h soit largement supérieure à la demande des animaux (1200 mg/h). Il a été démontré précédemment que l'ensemble de ces dispositions expérimentales ne stresse pas les animaux et permet ainsi le bon déroulement d'une expérimentation. Les animaux seront nourris à la main 2 fois par jour (entre 8h30/9h00 puis entre 16h30/7h00). Durant les études, des prélèvements seront réalisés à 3 ; 6 puis 9 mois pour l'expérience 1, à 24 mois pour l'expérience 2 et 3 et 6 mois pour l'expérience 3. Les animaux seront anesthésiés puis euthanasiés et leurs cerveaux, langue, sang seront prélevés dans le but de réaliser des analyses biologiques visant à déterminer le taux d'incorporation des lipides ainsi que des analyses moléculaires d'expression de gènes dans différentes zones cérébrales et linguales. Les animaux non euthanasiés pour les analyses (2250 poissons) mais essentiel pour le bien-être des animaux (densité importante pour le comportement grégaire des truites en élevage) seront non euthanasiés et reclassés.

Dans le cadre de la règle des 3R, soulignons que :

- Le remplacement n'a pas été possible, car l'étude des effets d'un régime alimentaire chez un animal ne peut pas se faire *in vitro* ou par des systèmes de mesures informatiques.
- Le raffinement a été respecté car aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants. Aussi les conditions d'élevage pendant l'expérience seront optimisées comme mentionné précédemment.
- La réduction a été un objectif réel, le nombre de poissons prélevé (mise à mort par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant) est calculé à minima (1350 sur 3600 : 37,5%), compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures

Enfin, un suivi quotidien du bien-être animal sera évalué à l'aide d'une fiche d'évaluation quantitative du point limite. Cette évaluation est basée sur un critère comportemental évaluant : la prostration et l'isolement prolongé de l'animal, la nage anormale, la prise alimentaire perturbée et la position inhabituelle dans la colonne d'eau. Le second critère physique permet lui d'évaluer le changement du volume anormal (ex : maigreur observé par la tête plus grosse que le corps), les lésions comportementales dues aux blessures ou maladies, l'apparition de malformations (scoliose, exophtalmie, tumeur) ainsi que l'aspect général de la peau. Si une note de 3 qui correspond au point limite ultime est scorée sur un des points à évaluer, l'animal sera euthanasié aussitôt via les procédures réglementaires.

14233 Objectif du projet: Évaluer l'activité pharmacologique de molécules après administration par voie topique ou systémique chez le rat ou la souris.

Avantages: Ce projet a pour but de démontrer l'activité pharmacologique en lien avec le mécanisme d'action ciblé et de définir une dose efficace reliée à un niveau d'exposition dans le tissu cible. Les données ainsi obtenues contribueront à la sélection de molécules et au choix des doses à utiliser chez l'homme pour les indications thérapeutiques visées.

Dommmages escomptés: En fonction des cibles pharmacologiques, il pourra être nécessaire d'induire une réponse biologique chez l'animal dans le but d'activer ou d'augmenter l'expression de la cible moléculaire concernée. Ces stimuli sont susceptibles d'induire une réaction inflammatoire locale ou systémique qui sera maîtrisée par le choix des doses du stimulus utilisé. Un produit analgésique pourra être utilisé si jugé nécessaire par le vétérinaire référent et/ou le directeur d'étude.

Le port de la collerette risquant d'entraîner une perte de poids, celle-ci sera suivie quotidiennement avec, le cas échéant, la mise en œuvre de conditions d'hébergement appropriées.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de pharmacologie et de pharmacocinétique adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

Choix des espèces: Les espèces rats et souris seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence d'outils spécifiques permettant l'analyse des protéines ou des gènes modulés dans ces modèles.

Nombre d'animaux: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées (biochimie, biologie moléculaire, morphologie, etc...) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, un maximum de 10 animaux par groupe expérimental sera utilisé pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés.

Le nombre optimum d'animaux par groupe expérimental sera défini par une approche statistique adaptée. Sur une période de 5 ans, un maximum de 11000 animaux (souris et/ou rats) sera utilisé.

Conditions d'hébergement et de soins:

Les animaux seront hébergés individuellement pour éviter les risques de bagarres pouvant entraîner des lésions cutanées, et le léchage entre individu des produits lorsqu'ils sont appliqués directement sur la peau. Cependant ils garderont un contact visuel et olfactif entre eux.

Lorsque le traitement est appliqué sur la peau de l'animal, et afin d'empêcher tout risque d'ingestion du produit dû au léchage, l'animal pourrait porter un dispositif de protection (collerette ; gilet de protection...). Dans ce cas, une période d'adaptation d'au moins 3 jours sera mise en place avant le début de l'étude et une attention particulière sera apportée sur l'état de santé général de l'animal, en particulier sur le poids.

L'hébergement est enrichi par la mise en œuvre de techniques d'enrichissement adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux leur permettant de reproduire au mieux leur comportement naturel (ex : maisonnette ou ouate dans la cage). La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

Le suivi des animaux sera assuré quotidiennement et des points limites spécifiques ont été établis afin d'anticiper toute dégradation de l'état de santé général des animaux et, le cas échéant, d'appliquer des protocoles d'analgésie adapté.

14234 Les coccidioses des volailles sont des affections très fréquentes dues à des parasites du genre *Eimeria*. Elles ont des conséquences économiques et sanitaires importantes, notamment dans les élevages de poulets. Si des mesures d'hygiène rigoureuse permettent de réduire le risque, elles sont le plus souvent insuffisantes. Bien que les approches prophylactiques actuelles connaissent un réel succès, l'incorporation de produits chimiques dans l'alimentation animale est largement remise en cause et continue de soulever des questions d'ordre sanitaire et sociétal. Avec l'émergence ces dernières années, de souches de plus en plus résistantes affaiblissant ainsi

l'intérêt et l'efficacité de l'utilisation de telles molécules, il apparaît nécessaire de trouver de nouvelles stratégies de lutte contre la coccidiose. Selon la recommandation de la Commission Européenne, le développement et l'évaluation d'alternatives aux méthodes existantes sont nécessaires. Le but de cette étude est d'évaluer l'innocuité d'un vaccin déjà commercialisé dans plusieurs pays hors Union Européenne, afin d'enrichir les moyens de lutte contre les coccidioses. Elle fait partie d'un projet global dont l'objectif ultime passera par des études sur la sensibilité et l'efficacité des souches vaccinales dans le but d'obtenir un enregistrement dans l'Union Européenne. On sait depuis très longtemps que les parasites du genre *Eimeria* peuvent induire une forte réponse immunitaire chez les volailles. De plus, les récents progrès techniques (atténuation des parasites pour réduire leur pouvoir pathogène et meilleures méthodes de vaccination) ont rendu la vaccination plus acceptable que par le passé et plusieurs auteurs reconnaissent que la vaccination avec des oocystes est économiquement viable et pourrait constituer une alternative à la chimiothérapie. A l'heure actuelle, la vaccination reste la meilleure stratégie pour prévenir l'apparition des maladies infectieuses et le bénéfice est largement supérieur au risque. Au cours de cette étape du projet, destinée à vérifier la sensibilité des souches vaccinales de deux vaccins aux additifs anticoccidiens, 400 poulets au maximum, seront vaccinés à la dose de référence à 1 jour d'âge. Les poussins seront suivis quotidiennement pour l'observation de l'état général de santé pendant 20 jours. Pour cette étude, l'effectif a été calculé sur la base d'essais antérieurs afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant de faire les tests statistiques adéquats. Les procédures ne devraient être à l'origine d'aucune souffrance. Les doses utilisées ne permettront pas d'induire un épisode de coccidiose avec des signes cliniques, mais plutôt une immunisation des animaux. Toutefois, si des signes étaient observés, ils ne devront pas dépasser les limites de tolérance établies, sans quoi une euthanasie compassionnelle sera réalisée. De nouvelles cages installées en 2017 permettent un meilleur raffinement dans l'hébergement, tel que la mise en place de perchoirs et de mobiles dans les cages, en plus d'un éclairage naturel respectant le rythme circadien des oiseaux. Enfin, enfin de projet, les oiseaux seront sacrifiés un par un, après étourdissement par électroanesthésie.

14235 La surexpression de Bcl-xL est liée à un mauvais pronostic dans certains cancers. Son implication dans la formation et la progression des tumeurs fait de Bcl-xL une cible potentielle pour la thérapie anti-tumorale. Un déficit de la fonction des plaquettes est observé lors de l'utilisation d'inhibiteurs de Bcl-xL en thérapie anti-tumorale.

Nous ne disposons malheureusement pas de modèles cellulaires permettant d'étudier l'impact de l'expression de Bcl-xL sur les plaquettes. Afin d'étudier la contribution sur la fonction des plaquettes de la localisation de Bcl-xL, nous avons généré des souris exprimant Bcl-xL uniquement à la mitochondrie. Ces souris, 18 mois après leur naissance, se reproduisent normalement et ne présentent pas de phénotype dommageable. Les 2 tests fonctionnels (activation des plaquettes et génération de la thrombine) pour analyser les fonctions plaquettaires seront réalisés sur les plaquettes purifiées à partir de prélèvements sanguins devant être effectués impérativement chez l'animal vivant.

Dans ce projet, 50 souris au maximum seront utilisées pour chaque test. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Le sang sera prélevé dans la veine cave des souris anesthésiées. Les souris seront mises à mort immédiatement après le prélèvement par dislocation cervicale.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale et après administration d'un analgésique. L'administration d'anesthésiques et d'analgésiques, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats.

Ce projet devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle de Bcl-xL sur les plaquettes et pourrait nous permettre de développer une stratégie visant à abaisser l'effet secondaire sur les plaquettes des inhibiteurs de Bcl-xL.

14236 Dans le système nerveux, les neurones sont connectés entre eux et communiquent grâce à des molécules appelées neurotransmetteurs. La transmission d'information se fait dans une zone de contact entre les neurones, appelée synapse au niveau de laquelle le premier neurone libère un neurotransmetteur qui agit comme une clé dans une serrure. En effet, il va pouvoir se fixer sur des molécules capables de le reconnaître, insérées dans la membrane de l'autre neurone, appelées récepteurs aux neurotransmetteurs. La force de la connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones connectés. Cette propriété qu'ont les synapses de changer leur efficacité est appelée plasticité synaptique. Elle est à la base de nombreuses formes de mémoire simples ou complexes permettant l'adaptation par des changements de comportements en réponse aux changements de l'environnement chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé. L'étude du fonctionnement des récepteurs et de la plasticité synaptique est donc importante pour comprendre les mécanismes des différents types de mémoires et de leurs perturbations. Notre groupe a montré dans des modèles *in vitro* de neurones de rongeurs en culture qu'une synapse peut changer sa force de connexion rapidement grâce des mouvements latéraux très rapides des récepteurs aux neurotransmetteurs dans la paroi des neurones, ce qui leur permettent d'être rapportés ou éloignés très vite au niveau de la synapse. En les immobilisant avec des molécules particulières, cette transmission synaptique est perturbée en perdant sa capacité à changer son efficacité et produire une réponse modulée, qui va être plus intense (phénomène appelé potentialisation à long terme ou LTP) ou ralentie (phénomène appelé, dépression à long terme ou LTD). C'est deux processus sont fondamentaux dans les différents types de mémoire. Il est important de reproduire ces données obtenues *in vitro* avec des approches plus intégrée. Nous utiliserons une lignée de souris transgénique dont un type de récepteurs a été modifié pour pouvoir l'immobiliser et étudier l'importance de cette immobilisation au cours de la plasticité synaptique. La modification de son génome n'a pas de conséquence sur le bien-être et la santé des animaux tout au long de leur vie ; elle n'a donc pas de phénotype dommageable. Le cervelet est une structure du cerveau où la LTD est importante. Notre projet portera sur l'étude de la LTD (ralentissement de la communication entre neurones) dans le cervelet de ces souris transgéniques et de sa perturbation lorsque les récepteurs sont immobilisés. Notre approche consistera donc à rapporter dans le cerveau, une molécule capable d'immobiliser les récepteurs (la BirA) soit par une chirurgie cérébrale ciblée au niveau du cervelet, soit par injection rétro orbitale (faite à l'arrière de l'œil sous anesthésie). Les deux approches seront menées au début de front pour déterminer au plus vite celle qui est la plus efficace qui sera alors choisie. Après récupération des animaux auront une courte série d'injection intrapéritonéale d'une vitamine, la biotine, capable de favoriser l'action de la BirA. Les animaux seront ensuite mis à mort de façon éthique pour récupérer le cerveau pour des études « *ex vivo* » sur des tranches de tissus frais de l'activité électrique des neurones communiquant entre eux, appelées aussi électro physiologiques. Ces études permettront de mesurer dans le cervelet le renforcement ou le ralentissement de ces communications dans les phénomènes de LTD/LTP décrites plus haut. Nous escomptons que nos résultats apporteront des données importantes sur la compréhension de la plasticité synaptique et l'implication du cervelet dans la mémoire procédurale.

Respect de la règle des 3R.

Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. Le concept de l'importance de la mobilité des récepteurs dans les phénomènes de plasticité synaptique a été identifié par notre équipe avec des approches *in vitro* de culture de neurones de souris de type sauvage comme de neurones de notre lignée transgénique. La preuve de ce concept a besoin d'utiliser des animaux pour le vérifier dans des approches plus intégrées avec la globalité du cerveau en fonctionnement. La lignée transgénique utilisée est très prometteuse pour apporter cette preuve.

Réduire: le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de donnée permettant d'atteindre une signification statistique. Pour ce projet de 3 ans, nous prévoyons d'utiliser 630 animaux.

Raffiner: à chaque étape du projet, le bien être de nos animaux sera au cœur de nos préoccupations. Nos animaux naîtront dans notre animalerie de haut statut sanitaire, hébergés en cages collectives, garnies de litières leur permettant de reproduire un comportement naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons, pour leur permettre de construire des nids, de jouer, ronger. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. Leur soin est confié à des personnels qualifiés et experts. Ils surveillent quotidiennement l'ensemble des animaux et de façon plus poussée et spécifique pendant les phases de récupération qui suit les procédures invasives (chirurgie, injection rétro orbitales). Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée.

14237 La morphine atténue les douleurs. Cependant, un traitement chronique provoque une tolérance à l'analgésie induite par la morphine. Il y a alors une diminution des effets de la morphine qui entraîne la nécessité d'augmenter les doses pour obtenir un effet équivalent. La tolérance est complexe et fait intervenir des phénomènes adaptatifs. L'inactivation des récepteurs à la morphine et leur implication dans la tolérance sont étudiées depuis de nombreuses années au niveau moléculaire mais aucun traitement thérapeutique n'a été développé jusqu'à présent. De manière surprenante, 25% des souris consanguines traitées à la morphine ne développent pas de tolérance. Une telle constatation laisse entrevoir une possibilité de traitement se basant sur les différences entre les souris devenues tolérantes et celles qui sont résistantes à l'apparition de la tolérance.

Notre projet évaluera les différences physiologiques et moléculaires qui observées chez les animaux réfractaires à la tolérance morphinique. Pour ce faire, nous utiliserons des souris sauvages, ainsi que deux souches de souris spécifiquement mutées pour le récepteur de la morphine dans les cellules microgliales. Quatre cohortes de ces 3 souches de souris recevront soit une injection unique de morphine ou de solution saline (contrôle correspondant à un traitement ponctuel), soit une injection répétée de morphine ou de solution saline (contrôle correspondant à un traitement chronique) durant 9 jours. Nous étudierons plus précisément des différences moléculaires dans une zone cérébrale majeure du traitement de l'information douloureuse (substance grise périaqueducule). La mise en évidence d'une différence ou d'une adaptation physiologique suite à un traitement chronique pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques majeures.

Ce projet utilise un modèle validé d'induction de la tolérance à la morphine. L'effet analgésique sera déterminé à l'aide d'un test de nociception basé sur le réflexe de retrait/léchage/saut de la patte arrière lorsque les animaux sont placés sur une plaque chaude à 54°C. Ce test, qui détermine le seuil de sensibilité nociceptif thermique, est considéré comme peu douloureux puisque l'animal peut retirer sa patte dès qu'il ressent une douleur. Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Les modèles de culture cellulaire se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés, la notion de tolérance étant uniquement visible et détectable chez l'animal par un test de comportement spécifique. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire.

Réduire : Un total de 699 souris mâles (233 souris C57BL6/J, 233 souris MOR-CX3XR1-Cre et 233 souris CX3XR1-eGFP-MOR-mCherry) sera utilisé lors de ces études. Ce nombre correspond au nombre minimal d'animaux par groupe permettant de mettre en évidence la sous population de 25% des souris réfractaires à la tolérance morphinique.

Raffiner : Les animaux sont placés en cage par groupe de 5 individus. Ils seront maintenus dans un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie). L'eau et la nourriture seront disponibles ad libitum. Les souris seront placées en cycle jour/nuit 12h/12h en

condition de température et d'hygrométrie contrôlée. Il n'est attendu aucun stress ni aucune douleur prolongée chez les animaux requis lors cette étude.

Un nombre total d'animaux à tester de 699 souris a été établi et se base sur les approches nécessaires au projet.

14238 Dans le cerveau, les cellules nerveuses ou neurones sont connectées entre elles et communiquent grâce à des molécules appelées neurotransmetteurs. Ces connexions entre les neurones s'appellent les synapses au niveau de lesquelles sont libérés les neurotransmetteurs. Ils agissent comme une clé dans une serrure en se fixant sur des molécules dites « récepteurs aux neurotransmetteurs », insérées dans la membrane du neurone, capable de reconnaître les neurotransmetteurs. La force de la connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones connectés. Cette propriété qu'ont les synapses de changer leur efficacité est appelée plasticité synaptique. Elle est à la base de nombreuses formes de mémoire simples ou complexes permettant l'adaptation par des changements de comportements en réponse aux changements de l'environnement chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé. L'étude du fonctionnement des récepteurs et de la plasticité synaptique est donc importante pour comprendre les mécanismes des différents types de mémoires et de leurs perturbations. Notre groupe étudie l'importance d'un type de récepteur aux neurotransmetteurs, appelés AMPA dans la plasticité synaptique en utilisant des modèles *in vitro* de neurones de rongeurs en culture. Il a montré que leurs mouvements sont fondamentaux dans la communication entre les neurones et sont possibles grâce à d'autres protéines qui aident à leur transport, les TARPs (transportation AMPA récepteurs protéines). La protéine Stargazin fait partie de cette famille des TARPS. Il existe un mutant spontané chez la souris pour cette protéine, la lignée stargazer qui permet d'analyser les conséquences de sa délétion sur les récepteurs AMPA et leurs mouvements. Cette souris stargazer présente néanmoins à l'état homozygote un phénotype assez marqué (homozygote = la mutation est présente sur les deux chromosomes d'une même paire). Cette mutation provoque chez les animaux homozygotes des troubles du comportement moteur, particulièrement reconnaissables dès 14 jours post natal. Ils sont plus petits que les hétérozygotes (la mutation est présente sur un des deux chromosomes d'une même paire) et wild type (= sans mutation) et ont des troubles de coordination de leurs mouvements perturbant leur démarche. Leurs muscles se contactent de façon pathologique provoquant des mouvements dits choréiformes de la tête. Ces troubles s'aggravent progressivement avec l'âge même si ces animaux peuvent vivre plus d'un an. L'enregistrement des ondes cérébrales de ces animaux montrent des tracés épileptiques de type absences.

Ce projet concerne la production d'homozygotes et leurs contrôles wild type pour un projet scientifique s'intéressant à la physiologie des récepteurs AMPA avec différentes approches de cultures cellulaires pour de l'imagerie à haute résolution, et de biochimie.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer: L'objectif de ce projet est de produire des animaux homozygotes pour des protocoles

* de cultures de neurones dissociés entre un jour et 4 jours post-natals

* de cultures organotypiques de tranches de cerveaux d'animaux entre 5 et 7 jours post natal.

*de protocoles de biochimie et d'immunohistochimie sur des cerveaux d'animaux de 3 semaines

Si l'ensemble de ces procédures ne nécessite pas d'évaluation éthique puisque les animaux utilisés sont mis à mort pour prélèvement du cerveau, la présence de ce phénotype justifie cette demande d'autorisation de projet. L'utilisation d'une lignée transgénique murine montrant une mutation spontanée pour la protéine Stargazin dans des modèles *in vitro* est plus efficace pour répondre à notre question scientifique de son influence sur le transport des récepteurs AMPA que d'autres approches telles que des techniques de mise en silence de gène comme les shRNA et pourra être un bon outil pour des approches plus intégrées ultérieures.

Réduire: pour réduire au maximum le nombre d'animaux, la production sera rationalisée par l'établissement de programmes d'élevage répondant au plus près à la demande réactualisée tous les 3 mois. Les nombre d'homozygotes nécessaires est de 540 pour les 5 ans du projet.

Raffiner: afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes sont mises en place: Les animaux sont hébergés en cages collectives, garnies de litières leur permettant de reproduire un comportement naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons, pour leur permettre de construire des nids et de jouer et de ronger. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée dès que l'âge auquel apparaissent les troubles liés à la mutation chez les homozygotes mais aussi dès l'apparition de douleur qui peuvent apparaître chez tous les animaux (pilo-érection, épilation et/ou posture voutée, immobilité à la sollicitation, agressivité à l'approche, pli peaussier), de blessures, plaies, abcès. L'ensemble de ces points déclenchera la mise en place de mesures adaptées pour améliorer l'état des animaux

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

Les adultes homozygotes ne seront pas conservés. Seuls les hétérozygotes sans phnéotype seront maintenus pour produire les homozygotes nécessaires au projet.

14239 L'ischémie-Reperfusion des membres inférieurs est un problème de santé publique, causant des dommages irréversibles aux tissus et pouvant mettre en jeu le pronostic vital. L'ischémie se caractérise par un manque d'oxygénation d'un tissu, secondaire à une interruption de la circulation sanguine. La reperfusion, nécessaire pour sauver le membre, est responsable d'autres lésions, comme l'altération de la mitochondrie qui fournit l'énergie à la cellule.

Parmi les traitements possibles, il y a le conditionnement ischémique. Il s'agit d'une succession de courts cycles d'ischémie-reperfusion (IR) qui sont réalisés avant l'IR (pré-), au cours de l'IR (per-), ou à la fin de l'IR (post-). L'intérêt de ce type de traitement est multiple. Ce ne sont pas des médicaments avec de potentiels effets secondaires. Par ailleurs, il a été montré que conditionner l'organisme est un bon moyen pour le protéger. Actuellement, le préconditionnement ischémique montre une protection, mais il est difficile à appliquer chez l'Homme. Il est donc intéressant de chercher une alternative applicable à la clinique, tel que le perconditionnement ischémique.

Nous souhaitons déterminer si le perconditionnement ischémique peut protéger le muscle squelettique subissant une ischémie-reperfusion.

Ce projet sera réalisé avec 60 souris.

La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration des procédures. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible car les altérations des tissus cibles lors de l'ischémie-reperfusion sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme.

La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Ainsi, nous avons vérifié au préalable que la patte controlatérale pouvait servir de témoin dans ce modèle d'ischémie-reperfusion unilatérale, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux participant au travail tout en conservant la puissance statistique nécessaire. La procédure d'ischémie sera réalisée sous anesthésie générale, pendant laquelle l'animal sera maintenu au chaud, suivie d'une prise en charge médicamenteuse de la douleur.

Le bien-être de l'animal sera pris en compte (groupement des animaux pour éviter le stress dû à l'isolement, enrichissement du milieu dans la cage par ajout de coton et de morceau de bois et soins quotidiens aux animaux). Par ailleurs, nous avons établi une grille de points-limite pour limiter la souffrance des animaux.

14240 Le cancer est la principale cause de mortalité en Europe et 14. 1 millions individus dans le monde sont affectés. Malgré les avancées dans le diagnostic et le traitement des cancers de nombreux patients succombent toujours à cette maladie. Il est donc urgent de développer de nouvelles études afin d'améliorer la prise en charge des patients cancéreux, ainsi que d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le système immunitaire est au centre de nouvelles approches thérapeutiques visant à induire une immunité anti-tumorale. Ces approches thérapeutiques, qui consistent à lever les freins (« checkpoints ») du système immunitaire, notamment sur les lymphocytes T, ont montré des résultats spectaculaires avec des taux de réponse avoisinant les 40% dans de nombreux patients cancéreux. Des études récentes ont établi un rôle majeur pour le microbiome intestinal (ensemble des micro-organismes présent dans l'intestin) dans l'efficacité de ces immunothérapies. En effet les patients cancéreux ou les souris porteuses de tumeurs, traitées avec des antibiotiques, réduisant la composition du microbiome intestinal, ne répondent pas à ces immunothérapies. Malgré un rôle crucial du microbiome intestinal dans l'efficacité des immunothérapies, comment la composition du microbiome intestinal affecte le développement de l'immunité anti-tumorale reste inconnu.

Nous proposons d'étudier la fonction des lymphocytes T intestinaux dans l'immunité anti-tumorale. Notre hypothèse est que les lymphocytes T présent dans l'intestin seraient activés par le microbiome intestinal et migrerait ensuite pour rejoindre le site tumoral. En présence d'immunothérapies ceux-ci seraient réactivés et contribuerait à l'immunité anti-tumorale. Pour tester cette hypothèse nous utiliserons des souris porteuses de tumeurs traitées ou non avec des antibiotiques afin d'éliminer leur microbiome intestinal. L'utilisation des souris est nécessaire, car la multiplicité des acteurs cellulaires et microbiens ainsi que leur action spatio-temporelle au cours des réponses immunitaires anti-tumorales, rends pour l'instant impossible une modélisation *in silico* ou *in vitro*.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 324 souris sont demandées sur une période de 5 ans. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre de souris a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire leur nombre. De plus, des approches ex-vivo seront utilisées pour remplacer l'utilisation des souris. Néanmoins les souris porteuses de tumeurs traitées ou non avec les antibiotiques représentent un modèle d'étude particulièrement adapté à nos objectifs. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte (hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés) de leurs naissances à leurs morts afin d'éliminer ou de réduire toute douleur, souffrance, angoisse et dommage susceptible d'être infligé à ceux-ci.

14241 L'infarctus du myocarde est responsable d'un grand nombre de décès dans le monde malgré une prise en charge de plus en plus rapide. Diverses cardio-pathologies vont affecter l'orientation des fibres musculaires constituant le cœur. L'imagerie de cette orientation, actuellement possible en imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion, est complexe et difficile à réaliser sur des cœurs battants, nécessite des IRM de recherche puissante et des méthodes réservées à quelques équipes de recherche dans le monde. Récemment, une technique en imagerie ultrasonore (US) 3D a été proposée et validée en comparaison avec des coupes histologiques. Cependant, l'orientation extraite ne contient pas l'information 3D mesurable en IRM. Ce projet vise donc à réaliser en imagerie IRM, US et histologique la mesure de l'anisotropie du muscle cardiaque en vue d'évaluer l'intérêt et l'impact de chaque méthode dans le cadre d'une future utilisation clinique. Afin de réaliser ce type d'imagerie, des séquences d'imagerie ultrarapide, dite par onde plane, seront utilisées en imagerie ultrasonore. La mesure, quant à elle, vise à mesurer la proximité des signaux ultrasonores afin d'évaluer une direction privilégiée.

Dans ce contexte, l'objectif du projet de recherche est de

- 1) proposer de nouvelles méthodes d'imagerie 2D-3D pour explorer la micro-structure fibreuse du cœur,
- 2) de comprendre la variabilité des mesures IRM/US,

3) évaluer l'impact d'un infarctus sur les mesures locales en vue d'estimer un potentiel transfert vers la clinique. Pour cela, l'exploration expérimentale chez le Porc avec/sans modèle d'infarctus, est une étape cruciale et préalable à toute étude clinique ultérieure.

Cette expérimentation (Etude pilote) sera réalisée chez le modèle porcin (Porc anesthésié, à thorax ouvert, sans réveil de l'animal). Les animaux seront aléatoirement répartis en deux groupes. Le premier sera constitué d'animaux devant subir une épreuve d'ischémie-reperfusion (IR), par occlusion de l'artère inter-ventriculaire cardiaque (IVA), mimant ainsi un infarctus du myocarde : Groupe IR. Le second groupe comprendra les animaux ayant subi la même préparation chirurgicale que le précédent, mais, sans épreuves d'IR : Groupe Contrôle.

Durant les étapes pré et post-ischémiques, deux types d'examen d'imagerie seront effectués à des temps préalablement fixés, pour le Groupe IR, et, à des temps comparables, pour le Groupe Contrôle. Les examens préconisés sont :

- Par IRM cardiaque durant laquelle, nous procéderons à des évaluations techniques d'imageries quantitatives simples et courantes en imagerie médicale : T1, T2 et ADC à différents temps, avant et après Occlusion de l'IVA

- Par Imagerie ultrasonore (US) 2D-3D : les déterminations seront effectuées au contact direct du cœur, également, avant et après l'occlusion de IVA.

Pour cette étude pilote, nous avons estimé à six ($n = 6$), le nombre d'animaux nécessaires, répartis également dans chacun des groupes. Toutefois, ce nombre de porcs pourra être réduit si les premiers résultats obtenus sont probants. Il est à noter que durant cette expérimentation, les animaux seront parfaitement anesthésiés, et, le déroulement s'effectuera sans réveil de l'animal. Cependant, une prise en charge de la douleur, notamment due à la chirurgie ou toutes autres manipulations, est prévue. Les techniques de protection utilisées sont sans douleur associée. Cette étude pilote permettra de montrer le potentiel des ultrasons dans la mesure des fibres cardiaques, technique d'imagerie plus simple à amener en clinique et auprès du patient. Cependant, malgré les résultats attendus sur cette étude pilote, le passage à la clinique ne sera pas direct car l'accès au cœur ne pourra pas se faire comme dans ce projet. Il sera donc nécessaire, une fois la technique validée d'estimer sa précision lors d'échocardiographie standard, c'est-à-dire en transthoracique, sans opération chirurgicale.

En fin d'expérimentation, les animaux, profondément anesthésiés, seront euthanasiés en conformité avec les procédures autorisées. Nous travaillons en collaboration avec différentes équipes, aussi bien au sein de notre laboratoire que dans d'autres laboratoires, nous avons pu ainsi établir avec eux un protocole de prélèvement de matériels biologiques (protocole de préservation de greffons rénaux, protocole de tests cutanés sur échantillons de peaux...).

14242 Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs connus de la mort cellulaire.

Leur surexpression est liée à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers. Leur rôle dans la formation et la progression des tumeurs en fait des cibles potentielles très intéressantes pour la thérapie anti-tumorale. Bcl-xL, un membre de la famille Bcl-2, présente une double localisation cellulaire à la fois dans la mitochondrie et au réticulum endoplasmique (RE). Notre projet vise à évaluer le rôle dans la mort cellulaire de la localisation de Bcl-xL.

Nous avons en effet montré, *in vitro*, que des fibroblastes exprimant la protéine Bcl-xL uniquement au niveau du RE ont une vulnérabilité accrue aux stimuli de mort par rapport aux fibroblastes normaux et aux fibroblastes exprimant Bcl-xL uniquement à la mitochondrie.

Il devient donc très important de valider *in vivo* les résultats que nous avons obtenus *in vitro*. Pour cela, nous avons généré des souris exprimant Bcl-xL uniquement au niveau de la mitochondrie. Ces souris, 18 mois après leur naissance, se reproduisent normalement et ne présentent pas de phénotype dommageable.

Pour analyser la régulation de la mort cellulaire par Bcl-xL, nous injecterons en intra-péritonéal aux souris 2 drogues (thapsigargine et tunicamycine) connues pour induire un stress cellulaire. 24h

après l'injection, les souris seront mises à mort et des tests fonctionnels seront réalisés sur les foies de ces souris.

Dans ce projet, 80 souris au maximum seront utilisées (40 pour analyser les effets de la thapsigargin et 40 pour analyser les effets de la tunicamycine) sur le foie des animaux.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal. Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale et après administration d'un analgésique. L'administration d'anesthésiques et d'analgésiques, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats.

Ce projet devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle la localisation au RE de Bcl-xL en cas du stress. Globalement, ces travaux pourraient mettre en évidence des rôles inconnus de la localisation de Bcl-xL dans le développement des mammifères et la progression tumorale.

14243 Le sepsis est une réponse inflammatoire généralisée d'origine infectieuse qui affecte principalement les individus déjà fragilisés. Dans les pays industrialisés, ce dernier représente autant de décès que l'infarctus du myocarde. En France, la mortalité des patients atteints d'un sepsis est de 27%, mais la mortalité de la forme la plus grave (choc septique) peut atteindre 50%. Malgré des progrès considérables accomplis au cours des 20 dernières années dans la compréhension de la physiopathologie associée au sepsis, aucune nouvelle thérapie n'a vu le jour. De nouveaux concepts doivent donc être élaborés. Plusieurs travaux récents conduits chez l'animal et chez des patients ont mis en lumière des dysfonctionnements importants des mitochondries lors du sepsis. Dans le cœur, le foie, les muscles mais aussi les cellules immunitaires, les mitochondries jouent un rôle essentiel puisqu'elles permettent la production d'énergie par les cellules. Il est à présent établi que la modification du fonctionnement des mitochondries dans les cellules immunitaires a un impact sur la défense de l'organisme contre les agents infectieux. Les mitochondries font l'objet d'un recyclage permanent dans les cellules selon un processus appelé mitophagie. Une altération de ce processus a des conséquences importantes sur la fonction des mitochondries et donc sur l'immunité. Ce projet vise donc à étudier chez la souris le rôle de la mitophagie dans les cellules immunitaires dans des modèles de sepsis d'origine intestinale ou induite par l'injection de lipopolysaccharides (composants des bactéries responsables du sepsis). Nous étudierons le potentiel thérapeutique d'une modulation de la mitophagie dans ces cellules immunitaires. La mitophagie sera modulée par des approches pharmacologiques ou en réalisant des greffes de moelle osseuse de souris déficientes pour la mitophagie. La réponse inflammatoire, la charge bactérienne et le taux de survie seront suivis suite à l'infection.

Remplacement : Le protocole vise à appréhender une physiopathologie complexe mettant en jeu l'interaction de plusieurs tissus (foie, rate, cœur, système immunitaire, sang). Ceci exclut l'utilisation de modèles *in vitro* ou de modèles animaux inférieurs dont le système immunitaire est trop éloigné de celui des mammifères. La souris est une espèce adaptée à ce projet. En effet, la physiopathologie du sepsis chez la souris est proche de ce qui est observé chez l'Homme. Réduction. Les effectifs ont été optimisés sur la base des coefficients de variabilité reportés dans la littérature et les différences attendues entre les différents groupes pour les paramètres clés-de l'étude (taux de survie et concentrations de LPS). Les expériences seront réalisées chez des souris âgées de 8 semaines Raffinement. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie suivies d'administration d'analgésiques. Les souris seront maintenues en groupe pour maintenir les interactions sociales. Le milieu d'hébergement un enrichissement sera ajouté dans les cages (tunnels et nids). La greffe de moelle osseuse requiert une irradiation des souris receveuses. Durant la période de prise de la greffe, les animaux recevront une antibiothérapie afin de limiter le risque infectieux. Des points limites ont été déterminés et seront appliqués le cas échéant. 428 souris seront utilisées sur 5 ans.

14244 Le projet du laboratoire est de participer à la compréhension des mécanismes régulant la mise en place, le maintien et la fonction des cellules endocrines (sécrétrices d'hormones) du pancréas et de

l'intestin. Ces cellules sont générées au cours du développement à partir de cellules dites progéniteurs qui vont se différencier et donner des cellules endocrines matures et fonctionnelles. Au cours du développement, la différenciation de ces progéniteurs fait l'objet d'une régulation très fine et complexe, impliquant aussi bien une communication entre les différents organes, que des processus inter- et intracellulaires.

De nombreuses questions demeurent encore sans réponse dans cette régulation, notamment les mécanismes permettant de déterminer de manière très précise la fonction, le maintien et le devenir des cellules endocrines indispensables à la régulation du métabolisme énergétique.

En plus des cellules pancréatiques, les cellules endocrines de l'intestin également appelées cellules entéroendocrines (EE), sont dispersées dans l'épithélium intestinal et participent également à la régulation de la glycémie grâce aux cellules L produisant du glucagon. L'altération de la régulation de la glycémie est à l'origine du diabète.

La compréhension des mécanismes responsables de la formation et du maintien des cellules entéroendocrines est indispensable au développement de thérapies, notamment contre le diabète.

Dans cette étude, nous souhaitons utiliser des modèles de souris portant des mutations affectant spécifiquement les cellules productrices d'hormones dans l'intestin afin d'effectuer des analyses du métabolisme (dosage de la glycémie, tolérance au glucose, réponse à l'insuline), des analyses histologiques, mais également de révéler des réseaux de gènes impliqués dans ces régulations grâce à des analyses du transcriptome. Nous utiliserons pour cela 90 souris sur une période de 5 ans.

Remplacement:

Nous avons déjà réalisé des expériences *in vitro* avec des lignées cellulaires. Le travail avec ces lignées ne permet pas de reproduire l'environnement physiologique, les interactions inter-organes etc. C'est pourquoi l'étude d'un organisme entier est nécessaire et nous permettra de réaliser des analyses dans des conditions physiologiques notamment avec des stimuli alimentaires tels que le glucose. Par ailleurs, la génétique de la souris est bien connue et nous permet d'inactiver le gène d'intérêt uniquement dans les cellules étudiées.

Réduction:

Tout est mis en place afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées lors des expérimentations, tout en nous permettant de rester dans des conditions de bonne exploitation statistique des résultats et leur publication. Le nombre d'animaux par lot est calculé pour palier à la variation entre les animaux et observer une population représentative du phénotype.

Raffinement:

Aussi bien pour l'élevage que pour les expérimentations, les protocoles appliqués tiennent compte du bien-être des animaux et visent à minimiser la douleur ainsi que le stress des animaux. Les souris qui participent à plusieurs tests auront au minimum 15 jours de phase de repos entre chacun de ces tests, pour garantir la pleine récupération de l'animal.

14245 Le projet du laboratoire est de participer à la compréhension des mécanismes régulant la mise en place, le maintien et la fonction des cellules endocrines (sécrétrices d'hormones) du pancréas et de l'intestin. Ces cellules sont générées au cours du développement à partir de cellules dites progéniteurs qui vont se différencier et donner des cellules endocrines matures et fonctionnelles. Au cours du développement, la différenciation de ces progéniteurs fait l'objet d'une régulation très fine et complexe, impliquant aussi bien une communication entre les différents organes, que des processus inter- et intracellulaires.

De nombreuses questions demeurent encore sans réponse dans cette régulation, notamment les mécanismes permettant de déterminer de manière très précise la fonction, le maintien et le devenir des cellules endocrines indispensables à la régulation du métabolisme énergétique.

Les cellules endocrines pancréatiques sont regroupées en structures, nommées îlots de Langerhans. Elles produisent notamment l'insuline (cellules beta) et le glucagon (cellules alpha), hormones antagonistes qui régulent la glycémie, et dont l'altération est à l'origine du diabète.

La compréhension des mécanismes responsables de la formation et du maintien des cellules endocrines est indispensable au développement de thérapies, notamment contre le diabète.

Dans cette étude, nous souhaitons utiliser des modèles de souris portant des mutations affectant spécifiquement les cellules productrices d'insuline afin d'effectuer des analyses du métabolisme (dosage de la glycémie, tolérance au glucose, réponse à l'insuline), des analyses histologiques, mais également de révéler des réseaux de gènes impliqués dans ces régulations grâce à des analyses du transcriptome. Nous utiliserons pour cela 130 souris sur une période de 5 ans.

Remplacement:

Nous avons déjà réalisé des expériences *in vitro* avec des lignées cellulaires. Le travail avec ces lignées ne permet pas de reproduire l'environnement physiologique, les interactions inter-organes etc. C'est pourquoi l'étude d'un organisme entier est nécessaire et nous permettra de réaliser des analyses dans des conditions physiologiques notamment avec des stimulés alimentaires tels que le glucose. Par ailleurs, la génétique de la souris est bien connue et nous permet d'inactiver le gène d'intérêt uniquement dans les cellules étudiées.

Réduction:

Tout est mis en place afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées lors des expérimentations, tout en nous permettant de rester dans des conditions de bonne exploitation statistique des résultats et leur publication. Le nombre d'animaux par lot est calculé pour palier à la variation entre les animaux et observer une population représentative du phénotype.

Raffinement:

Aussi bien pour l'élevage que pour les expérimentations, les protocoles appliqués tiennent compte du bien-être des animaux et visent à minimiser la douleur ainsi que le stress des animaux.

Les souris qui participent à plusieurs tests auront au minimum 15 jours de phase de repos entre chacun de ces tests pour garantir la pleine récupération de l'animal.

14246 L'hyperuricémie est définie comme une augmentation du taux d'acide urique sanguin (> 68 mg/l chez l'homme). Cette pathologie est associée à un risque cardiovasculaire accru, au déclin de la fonction rénale et au développement de la goutte. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette hyperuricémie, notamment la diminution de la fraction excrétée de l'acide urique par le rein. A l'inverse, une augmentation de l'excrétion rénale d'urate favorise la formation de calculs urinaires. Cette maladie lithiasique peut être particulièrement invalidante et peut, à long terme, entraîner une insuffisance rénale chronique. Récemment, une épidémie de goutte sévère a été décrite dans le nord du Vietnam, région fortement exposée aux dérivés de la dioxine pendant la guerre du Vietnam. Ces patients ne présentent pas les facteurs de risque traditionnels de la goutte (surpoids, syndrome métabolique, consommation de produits riches en purines). Une origine toxique est donc probable, mais le mécanisme n'est pas encore connu. L'exposition aux dioxines pourrait expliquer cette situation. Plusieurs études ont en effet montré que les sujets exposés à la dioxine ont des taux d'acide urique sanguins plus importants. De plus, le gène qui régule l'expression d'un transporteur majeur de l'acide urique (GLUT9) est régulé par le récepteur à la dioxine (AHR). Enfin, une équipe a récemment rapporté la présence de nombreux calculs d'acide urique dans la vessie de souris mutées pour le récepteur AHR.

Nous émettons l'hypothèse que le récepteur de la dioxine (arylhydrocarbonreceptor-AHR), exprimé dans le tubule proximal, régule l'excrétion rénale d'urate et donc l'uricémie.

Nous souhaitons donc évaluer l'impact d'une modulation du récepteur à la dioxine sur le comportement rénal des urates et de l'acide urique. Pour cela, nous souhaitons étudier un modèle génétique (souris mutée pour le récepteur AHR) et un modèle pharmacologique (agonistes et antagonistes d'AHR).

Dans ces différents modèles, nous évaluerons les excrétions fractionnelles urinaires d'urates, la composition des lithiases urinaires produites par ces différents modèles animaux. Nous étudierons les différents transporteurs connus de l'urate au niveau du rein et du tube digestif de nos modèles

grâce à des techniques de biologie moléculaire et d'immunofluorescence. Enfin, nous caractériserons les calcifications tissulaires par des techniques de spectrométrie infrarouge.

Nous espérons démontrer qu'il existe un mécanisme rénal de transport de l'urate impliquant AHR qui régule les transporteurs tubulaires notamment proximaux, permettant d'expliquer l'hyperuricémie et la goutte liée à la dioxine. Ces mécanismes pourraient également permettre de mieux expliquer les troubles du métabolisme de l'acide urique chez les patient diabétiques (goutte, lithiase, hyperuricémie).

Notre modèle et nos procédures expérimentales sont optimisées selon la règle des 3Rs (reduce, replace, refine). En effet, le modèle vivo est indispensable en raison des multiples interactions qui existent entre les différents récepteurs et leurs ligands au niveau du tubule rénal. Le modèle de tubule rénal *in vitro* n'est pas encore suffisamment complet pour permettre notre étude *in vitro*. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir 5 groupes de 12 animaux, 6 mâles et 6 femelles (un modèle pharmacologique comportant 1 groupe de 12 animaux traités par un agoniste de AHR, 1 groupe de 12 animaux traité par un antagoniste de AHR et un groupe contrôle de 12 animaux, ainsi qu'un modèle génétique de 12 de souris (AHR-KO) et le groupe contrôle approprié de 12 souris. Soit 60 souris au total. Dans le cadre du « raffinement », aucune intervention invasive n'est envisagée en dehors du gavage par les agonistes et antagonistes. Une grille de suivi sera mise en place afin de suivre les animaux et leur état général au quotidien. Les animaux seront hébergés en portoirs ventilés, une litière de cellulose enrichie avec des billes de cellulose que les animaux devront déployer pour y confectionner des nids ainsi que des bûchettes de bois de peuplier seront ajoutés à la litière pour que les animaux puissent ronger.

14247 Notre laboratoire a déjà caractérisé *in vitro* l'action du VEGF-C sur les cellules souches neurales et les cellules endothéliales lymphatiques. Nous voulons maintenant tester les effets de la signalisation VEGF-C/VEGFR3 sur la maintenance et l'activité des cellules souches neurales et des vaisseaux lymphatiques méningés au cours du vieillissement, dans le contexte de maladies neurodégénératives, et dans l'optimisation des greffes intracérébrales de cellules souches afin de réparer les tissus cérébraux. Les conditions *in vitro* ne reproduisent qu'une partie de la complexité des signaux moléculaires (ligands, matrices extracellulaire) et des interactions cellulaires dans la niche neurogénique qui sont réunis *in vivo*. L'ensemble de nos études ne peut donc être conduit que par des expérimentations *in vivo* et ne sont pas remplaçables par des expériences *in vitro* sur cellules isolées.

Nos études nécessiteront environ 900 souris au cours des 5 prochaines années, soit environ 15 souris par mois et 180 par an. Le nombre d'animaux a été calculé de façon la plus fine pour s'assurer d'avoir des résultats statistiquement exploitables tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés. Toutes nos expérimentations *in vivo* sont décrites dans notre protocole expérimental et sont encadrées par lui, avec des contrôles réguliers des animaux et des points limites établis pour réduire la souffrance et la douleur des animaux et limiter au maximum la variabilité des résultats expérimentaux. Un intérêt particulier sera porté à l'optimisation des conditions d'anesthésie et d'analgésie ainsi qu'à l'enrichissement de l'environnement de vie, ce raffinement des conditions expérimentales traduisant un respect vigilant de la qualité de vie des animaux tout en permettant l'amélioration de la reproductibilité des résultats expérimentaux.

Le développement, le maintien et la réparation des tissus nerveux dépendent d'une part de l'activité des cellules souches neurales, qui produisent et renouvellent les cellules nerveuses, et d'autre part du lien neurovasculaire qui permet de connecter le tissu nerveux avec le reste de l'organisme.

Nous avons montré que les cellules neurales et vasculaires partageaient des systèmes de signalisation communs. Par exemple, le récepteur VEGFR3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3) est exprimé par les cellules souches neurales murines/humaines et par les cellules endothéliales lymphatiques. Nous avons aussi découvert que le ligand du VEGFR3, VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor-C) activait les cellules souches neurales en les faisant quitter leur état quiescent pour entrer en division et en différenciation, et également stimulait la croissance des vaisseaux lymphatiques des méninges. Afin de visualiser les cellules souches neurales et les cellules endothéliales lymphatiques exprimant le VEGFR3, nous avons développé une souris

transgénique exprimant un rapporteur fluorescent (Venus, aussi appelé YFP) sous le contrôle des séquences régulatrices du VEGFR3.

Dans ce contexte nos objectifs actuels sont :

- Identifier des sous-populations de cellules souches neurales exprimant VEGFR3 dans différentes régions du cerveau adulte ;
- Caractériser les gènes clefs qui sont associés à la quiescence, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales *in vivo*.
- Analyser les interactions cellulaires et moléculaires entre les cellules souches neurales et le réseau vasculaire cérébral et méningé.
- Analyser les conséquences des interactions neurovasculaires sur le vieillissement cérébral, les maladies neurodégénératives et la réparation des tissus cérébraux.

14248 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative incurable qui, en raison du vieillissement croissant de la population, est devenue un réel problème de santé publique. Les recherches thérapeutiques jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier une cible pertinente. Tout au plus les traitements prescrits permettent de modérer les symptômes mais en aucun cas de stopper durablement l'évolution des lésions cérébrales et le déclin intellectuel des patients.

Au cours de la maladie d'Alzheimer, différentes protéines s'accumulent de façon anormale dans le cerveau des patients. L'une de ces protéines, nommée A β , se dépose sous forme de plaques (plaques amyloïdes) et a fait l'objet de très nombreux travaux de recherche, chez l'animal, et aussi chez l'homme, lors d'essais cliniques. Malheureusement les inhibiteurs pharmacologiques de la production d'A β ou les « vaccins » anti-A β n'ont jusqu'à ce jour pas montré d'efficacité chez les patients. Une deuxième protéine, la protéine tau, précipite, elle, au cœur des neurones et fait actuellement l'objet de nombreuses recherches cliniques et précliniques. Un obstacle majeur aux thérapies anti-Alzheimer réside dans l'existence d'une barrière « sang-cerveau » qui isole le cerveau du milieu extérieur. Cette barrière a une fonction importante de préservation du cerveau en isolant cet organe des substances indésirables pouvant se trouver dans la circulation sanguine. La contrepartie est la difficulté voire l'incapacité à produire des molécules neurothérapeutiques capables de franchir cette barrière pour agir sur leurs cibles cérébrales.

Un moyen de contourner la barrière sang-cerveau est d'appliquer un champ d'ultrasons localement qui va pouvoir distendre, de façon transitoire, les parois étanches de la barrière et permettre la pénétration de drogues dans le tissu cérébral. Cette technique d'ouverture de barrière, dénuée d'effets secondaires, a déjà permis d'améliorer le traitement de patients souffrant de certaines tumeurs cérébrales. Notre projet va spécifiquement consister à utiliser cette technique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer par le biais d'une thérapie anti-tau. Le travail sera réalisé sur des souris génétiquement modifiées pour reproduire les accumulations de protéine tau caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Les souris seront anesthésiées et on réalisera l'administration d'anticorps anti-tau par injection intraveineuse combinée à l'ouverture transitoire de leur barrière sang-cerveau. Ce traitement sera répété 1 fois par semaine pendant 2 mois. Les souris seront ensuite évaluées dans un test de mémoire. Nous faisons l'hypothèse de meilleures performances chez les souris traitées vs non-traitées. A la fin de l'étude l'examen du cerveau des souris sera réalisé afin de confirmer la régression des lésions tau suite aux traitements.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 140 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée.

1) remplacement : ces études sont un préalable aux essais cliniques chez l'homme (essais déjà initié pour d'autres pathologies telles que les tumeurs cérébrale). Les travaux visent à établir l'efficacité des traitements chez l'animal modèle de maladie d'Alzheimer et cette étape est indispensable avant d'envisager des applications pour les patients.

2) réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données reproductibles et donc solides ;

3) raffinement : les animaux seront soumis à une procédure non-invasive (les ultrasons ne nécessitent aucune chirurgie) sous anesthésie générale. Les paramètres vitaux des animaux sont contrôlés tout au long de la procédure. Le réveil des animaux est surveillé et des études réalisées dans différentes espèces animales et chez l'homme n'ont pas mis en évidence d'effets secondaires aux ouvertures transitoires de barrière.

14249 Nous étudions les protéines MAGUKs, impliquées dans l'ancrage et l'organisation des canaux ioniques dans la membrane des cardiomyocytes. Ces protéines jouent un rôle clé dans la régulation des courants ioniques dans les myocytes cardiaques. L'objectif de notre recherche est de mieux comprendre la physiopathologie des arythmies, notamment lors du remodelage myocardique, en lien avec l'expression de ces protéines.

- Etude 1. Conséquences fonctionnelles de l'inactivation de protéines MAGUKs chez le rat nouveau-né et adulte : Un mauvais adressage ou une perte de l'interaction des canaux ioniques avec les protéines MAGUKs conduisent à des altérations de l'excitabilité cellulaire et par conséquent à des troubles du rythme. Notre objectif est d'étudier les effets de l'inactivation *in vivo* de la MAGUK CASK sur l'activité cardiaque *in vivo* par échographie et électrocardiographie par l'utilisation de virus adéno-associés (AAVs). Le niveau d'expression de CASK varie avec la maturation du myocarde, deux stades de développement ont été définis : des rats nouveau-nés et des rats adultes.

- Etude 2. Conséquence fonctionnelle de l'inactivation de protéines MAGUKs dans le remodelage myocardique chez le rat: Le modèle d'infarctus du myocarde (IDM) est l'archétype de remodelage acquis complexe caractérisé par des zones ischémiques cicatricielles, bordantes désorganisées et distantes non-ischémisées mais remodelées. L'objectif est de déterminer si l'inactivation de CASK au moment de la mise en place du remodelage myocardique aura des conséquences bénéfiques sur la fonction cardiaque. Les rats contrôles et IDM seront injectés avec les AAV par voie systémique au moment de la chirurgie et une analyse fonctionnelle sera réalisée par échocardiographie et ECG de surface à différents stades.

- Etude 3. Etude de la surexpression de formes tronquées de protéines MAGUKs sur les propriétés fonctionnelles des cardiomyocytes *in vitro* : Les canaux ioniques sont adressés et stabilisés dans des domaines spécialisés du myocyte par des protéines de la famille des MAGUKs. L'objectif de cette étude est de déterminer si l'expression de formes tronquées de CASK conduit à un mauvais adressage des canaux ioniques dans les domaines spécialisés de la membrane des cardiomyocytes ou une perte de l'interaction des canaux ioniques. Une approche d'injection intracardiaque *in vivo* sous monitoring échographique sera utilisée pour délivrer les différents adénovirus afin d'étudier 3 jours plus tard les courants ioniques et la localisation des protéines.

- Etude 4. Etudes fonctionnelles *in vitro*: Après le phénotypage cardiaque les rats utilisés dans les études 1 et 2 seront utilisés pour des expériences *in vitro* : enregistrement des courants ioniques, enregistrement des potentiels d'action cellulaires, mesures immunohistochimiques.

Nous utiliserons au maximum 340 rats Wistar en 5 ans. Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1-Pour les études 1 et 2, les volumes injectés seront établis en accord avec le volume sanguin de l'animal afin d'injecter les plus petits volumes possibles.

2-Pour l'étude 3 (infarctus du myocarde), bien que les traitements testés ciblent la fonction ventriculaire, nous préleverons les oreillettes et les ventricules ainsi que d'autres organes des animaux non traités contrôles et malades et des animaux traités pour extraire les ARN messagers (ARNm) et les protéines. Nous pourrions ainsi constituer une banque pour des analyses omiques postérieures qui permettront une caractérisation de nos modèles de dilatation ventriculaire et auriculaire et qui pourra être utilisée par d'autres équipes pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'insuffisance cardiaque. En outre, une seule intervention est prévue pour réaliser le protocole de chirurgie thoracique et d'injection de virus pour réduire le stress lié à l'intervention et le nombre d'anesthésies.

3- Pour l'étude 4, seule la paroi ventriculaire ayant reçu l'injection de virus sera utilisée pour les études omiques (ARNm, protéines). Les cellules infectées seront identifiables grâce à un rapporteur

fluorescent ; les cellules non infectées serviront de contrôle pour des expériences d'électrophysiologie pour d'autres utilisateurs de l'équipe travaillant sur de projets différents. Les volumes seront adaptés au poids de l'animal ; les virus seront injectés en utilisant un bras micromanipulateur pour réduire la durée de l'intervention.

4-Les animaux seront stabulés en groupe (1 portée/cage pour les rats nouveau-nés, 2 rats/cage pour les adultes) en portoirs ventilés avec : -enrichissement de la sciure avec de la ouate, -enrichissement de l'environnement structurel et social favorisé par des activités physiques et cognitives (des jeux cartonnés), -accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. La température et l'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (6h-18h).

5- Une surveillance quotidienne sera effectuée par les zootechniciens et hebdomadaire par le porteur de projet pendant laquelle un tableau de score permettra d'évaluer les points limites : -lésion cutanée, -incapacité à se déplacer, -toiletage et -posture de l'animal. De manière globale, le comportement et l'aspect physique et expression faciale seront analysés. Dans le cas où un de ces points limites serait atteint, des procédures d'euthanasie appropriées afin de réduire la souffrance seront mises en place.

14250 Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules est la principale cause de décès par cancer dans le monde. La majorité des patients présentent un stade avancé de la maladie au moment du diagnostic, et sont traités par chimio/radiothérapie ou immunothérapie. Toutefois, en dépit des traitements, la survie à cinq ans n'est que de 15%, ce qui est principalement dû aux métastases et aux rechutes après traitement.

Le but de ce projet est de caractériser la réponse immunitaire anti-tumorale pendant la progression tumorale. Nous souhaiterions connaître la composition, l'activation et la fonction des cellules immunitaires. Pour ce faire, nous envisageons de sacrifier les souris à différents temps aux cours de l'expérience puis, nous voudrions déterminer plus en détail, l'implication d'une population rare de cellules immunitaires, les cellules Natural Killer (NK) dans la progression tumorale et caractériser l'infiltrat immunitaire.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris C57Bl/6 albinos. Le nombre total des souris utilisées sera de 450 : 180 souris dans la procédure 1 ; caractériser l'infiltrat immunitaire selon 4 temps de sacrifice et 270 souris dans la procédure 2 : les souris recevront des injections d'anticorps NK1. 1 et seront instillées de cellules LLC-luc par voie intratrachéale, pour caractériser la réponse immunitaire anti-tumorale.

La règle des 3R sera appliquée :

Pour ces expériences, les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions le rôle des cellules NK sur la progression des tumeurs pulmonaires dans un organisme ou le système immunitaire joue un rôle important. Ceci ne peut donc pas être étudié *in vitro*.

Le nombre d'animaux en expérimentation est réduit au maximum : les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles.

La méthodologie utilisée pour raffiner, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : des points limites ont été établis, pour définir à quel moment sacrifier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

14251 Le glaucome est la seconde cause de cécité dans le monde avec plus de 4,5 millions de patients. Sa prévalence est de l'ordre de 5-6% chez les plus de 60 ans et l'incidence de cette maladie ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population. Le glaucome provoque la mort des neurones ganglionnaire de la rétine dont les prolongements (appelés axones) constituent le nerf optique, l'unique voie de sortie des informations visuelles vers le cerveau. Ainsi, dans le glaucome, la rétine est toujours fonctionnelle mais se retrouve progressivement déconnectée du cerveau. Le dépistage des patients est souvent tardif et intervient alors que la vision est déjà irrémédiablement altérée. D'autres pathologies cécitantes, telles que les neuropathies optiques héréditaires, ou les lésions traumatiques du nerf optique s'expliquent également par une perte des neurones ganglionnaires. Enfin, la sclérose en plaques (environ 100 000 cas en France) provoque chez la

plupart des patients une destruction de la myéline dans le nerf optique ce qui entraîne des pertes de vision, parfois permanentes/irréversibles. Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de restaurer la vision quand le nerf optique est atteint. Nous souhaitons étudier la régénération du nerf optique après lésion chez des souris mutantes pour un gène impliqué dans la dégénération. Nous allons utiliser au maximum 78 souris pour ce projet. Lorsque les souris proviennent de l'extérieur, une période d'acclimatation de 5 jours est observée avant de les faire entrer en expérimentation. Tout au long des procédures, les souris de même sexe restent hébergées en groupe.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement, les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette, des bâtons à ronger ainsi que de la nourriture et boisson à volonté. Les animaux recevront une analgésie par injections sous cutanée de buprénorphine pour la réalisation des expérimentations, et toutes les expérimentations seront effectuées sous anesthésies. A la suite des expérimentations, les animaux seront surveillés quotidiennement. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. La complexité de la régénération axonale et de la dégénérescence rétinienne est telle que les études ne peuvent se faire *in vitro*.

14252 Comprendre comment les circuits neuronaux s'organisent et intègrent les informations sensorielles afin de générer un comportement approprié est un objectif fondamental des neurosciences. Ceci nécessiterait de pouvoir observer des cellules individuelles simultanément en différents endroits du cerveau, ce qui est aujourd'hui très limité chez les vertébrés en raison de la grande taille du cerveau et de son opacité. Notre projet vise à introduire un nouveau modèle animal de vertébré qui résolve ces deux problèmes. Il s'agit d'un poisson d'eau douce qui présente à la fois une très petite taille et une transparence presque totale même à l'âge adulte, lorsque le circuit neuronal et les comportements associés sont matures. Ceci en fait un modèle très prometteur pour l'analyse du fonctionnement du cerveau vertébré adulte à une résolution cellulaire.

Le présent projet vise à caractériser le comportement de cette espèce à différents stades larvaires et adultes et à analyser l'activité neuronale associée grâce principalement à des techniques non invasives de microscopie. Ces techniques ont toutes été déjà mises au point pour le poisson zèbre *Danio rerio*, un vertébré proche de ce nouveau modèle mais plus gros et transparent uniquement pendant les premiers jours de vie embryonnaire et larvaire. Nous prévoyons d'utiliser 1890 animaux (1230 larves et 630 adultes) pour ce projet.

Remplacement : Les études en culture cellulaire ne permettent pas de reconstituer les interactions cellulaires complexes permettant d'analyser la mise en place et la fonctionnalité d'un circuit neuronal. La complexité structurelle et fonctionnelle du système nerveux empêche l'utilisation des modèles *in silico* ou *in vitro*, notre projet nécessite donc une approche *in vivo* sur l'animal. L'établissement d'un nouveau modèle de poisson classé dans les vertébrés inférieurs permettra de remplacer au moins partiellement l'expérimentation sur des vertébrés supérieurs.

Réduction : Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Dès que cela est possible nous utiliserons les mêmes animaux pour différentes expériences, en particulier pour les stades adultes, afin de répondre aux questions des différents aspects du projet, diminuant d'autant le nombre d'individus nécessaires. De plus, la plupart de nos expérimentations étant des observations de la réponse de l'animal à un stimulus donné (visuel ou moteur), nous utiliserons en contrôle le comportement du même animal avant le stimulus. Ce contrôle interne permet de diviser par 2 le nombre d'animaux nécessaires et supprime l'erreur due à la variabilité inter-individus.

Nous élèverons le nombre minimal d'embryons nécessaires au maintien d'une lignée (60 adultes). La population adulte de poissons utilisée pour produire les embryons est ainsi restreinte pour limiter le nombre d'animaux mais suffisamment développée pour assurer des conditions de reproduction efficaces pour les études envisagées.

Raffinement : Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux. Les autres manipulations, invasives ou nécessitant une immobilisation, seront conduites sur animaux anesthésiés. Dans chaque cas, nous suivrons les signes visibles d'un animal souffrant et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience ou à une euthanasie. Concernant l'élevage, des poissons trop vieux pour la ponte ou présentant des signes de maladie seront euthanasiés afin d'éviter tout risque de souffrance.

14253 La recherche thérapeutique translationnelle développée au sein de notre unité nécessite différents modèles expérimentaux préclinique chez la Souris principalement et le Rat. Notre unité est spécialisée dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques chimiques et biologiques dans le traitement des conflits inflammatoires en transplantation, maladies inflammatoires et auto-immunes, et dans le cancer, ainsi que dans le traitement de différentes pathologies néoplasiques, de la tumeur solide aux leucémies. Le développement de ces approches nous amène à leur évaluation dans des modèles simples de culture cellulaire par exemple, puis dans des modèles plus complexes permettant de reproduire un environnement biologique au plus près de la condition réelle (l'Homme).

Nous avons ainsi développé différents modèles et utilisons des modèles communs comme les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), d'arthrite, de maladies chroniques de l'intestin, de transfusion, d'inflammation cutanée et pulmonaire ou encore des modèles de sepsis. Les modèles de transplantation sont des modèles basés sur la greffe de cellules hématopoïétiques, des approches de greffe de peau ou d'artériole. Enfin les modèles expérimentaux de cancérogénèse sont des modèles de greffe de tumeurs murines ou humaines comme les leucémies T et B, différentes lignées de cancer du côlon, du sein, de mélanomes, ou du pancréas. Ces différents modèles sont réalisés à l'aide d'animaux sauvages ou transgéniques permettant d'adresser en particulier un mécanisme d'action, ou encore à l'aide d'animaux immuno-déficients ou encore humanisés permettant d'adresser des approches thérapeutiques avec des produits biologiques humains. Notre recherche devrait nécessiter dans les 5 années à venir 109500 rongeurs (souris et rats).

Ces modèles sont pratiqués depuis plusieurs années au sein du laboratoire ont bénéficiés au cours des années passées de nombreuses améliorations notamment en termes de technicité et de prise en compte de la douleur et de la réduction du nombre d'animaux. Cette expertise nous permet le respect de la règle des 3R. Nous avons par exemple pu mettre en place des techniques (préhension optimisée), de l'enrichissement (pulpe de bois) et du matériel permettant une anesthésie et une euthanasie gazeuse et contrôlée des animaux, d'utiliser des médicaments (sous certaines conditions de non interaction avec l'expérience) d'analgésiques et/ou anti-inflammatoires pour limiter la douleur post-interventionnelle ou encore des tapis chauffant à sonde rectale permettant le maintien de la température corporelle lors d'anesthésie prolongée. De plus, notre expérience dans certains modèles nous permet une homogénéité et répétabilité des modèles permettant la réduction du nombre d'animaux des groupes contrôles, par exemple. Enfin, les technologies actuelles (comme la culture cellulaire sphéroïde ou d'organoïdes) maintenant disponibles au laboratoire, nous permettent de nous passer de certains modèles.

14254 Les traitements anti-tumoraux ont beaucoup progressé ces dernières années. Cependant, même si leur spécificité vis-à-vis de certains types de cancer s'est améliorée, ils sont souvent accompagnés d'une toxicité secondaire importante.

Les immunothérapies (anticorps anti-CTLA4 et anti-PD1) sont utilisées en combinaison ou non dans plusieurs types de cancer tels que le mélanome ou le cancer de la prostate. Néanmoins, cette thérapie a un coût important et n'est efficace que chez 15 à 30% des patients d'où la nécessité de trouver des indicateurs prédictifs de réponse ainsi que de nouvelles combinaisons thérapeutiques pour augmenter la proportion de patients bénéficiant du traitement. L'anti-CTLA4 et l'anti-PD1 permettent en particulier une réinduction de la réponse immune qui se trouve inhibée par les cellules cancéreuses. Cette efficacité clinique s'accompagne malheureusement d'effets secondaires

pouvant être graves comme par exemple des inflammations intestinales de haut grade induites chez 20 à 30% des patients nécessitant parfois l'interruption du traitement.

L'oxaliplatine est une chimiothérapie classiquement utilisée dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques et le traitement adjuvant du cancer du côlon après résection complète de la tumeur primitive. Le cancer colorectal étant le 3ème cancer le plus fréquent en France, l'oxaliplatine est largement employée mais son efficacité s'accompagne d'une toxicité intestinale provoquant entre autres nausées et diarrhées (dans plus de 40% des cas), causes majeures d'arrêt prématuré du traitement.

Il s'avère donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes d'action et de toxicité de ces traitements afin de limiter la toxicité tout en conservant l'efficacité anti-tumorale. Dans ce contexte, les résultats préliminaires de nos collaborateurs et de notre propre laboratoire nous conduisent à étudier les mécanismes d'action en lien avec la microflore intestinale chez des modèles de souris injectées par des lignées cellulaires tumorales.

Durant ce projet, un maximum de 7800 souris sera utilisé pendant la période proposée de 5 ans, sous réserve de résultats prometteurs. Ce nombre maximal d'animaux se justifie par la combinaison des paramètres expérimentaux permettant l'étude des mécanismes d'intérêt.

Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. En particulier, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaires et suffisants pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Néanmoins, ces procédures ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier proche de l'homme). Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Un suivi particulier sera mis en place après injection des lignées tumorales tenant compte d'une taille limite précise de la tumeur et d'une possible évolution morbide.

14255 Les troubles anxieux généralisés se caractérisent par un état d'anxiété persistante et excessive et sont associés à des altérations des niveaux de dopamine. Certains symptômes résulteraient en partie d'un dysfonctionnement des circuits neuronaux contrôlés par la dopamine au niveau de l'amygdale (structure cérébrale jouant un rôle important dans le contrôle des émotions).

Ce projet a pour objectif de caractériser les neurones cibles de la dopamine (c'est à dire ceux exprimant les récepteurs dopaminergiques) dans l'amygdale et de préciser le rôle fonctionnel des récepteurs à la dopamine dans le contrôle des réponses émotionnelles.

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

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante.

Réduire:

Cette étude anatomo-fonctionnelle s'articulera autour de 2 objectifs qui impliqueront 3 procédures expérimentales.

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 720 sur une période de 4 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées. Dans le but d'une exploitation maximale des données obtenues, plusieurs régions cérébrales seront systématiquement analysées.

Raffiner:

Toutes les souris seront utilisées de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Les animaux seront hébergés en groupe dans des environnements enrichis (nids végétaux.). Afin de diminuer le stress, les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs avant chaque procédure expérimentale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de

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

Remplacer:

Le projet reposant l'établissement de liens de causalité entre l'identité moléculaire et cellulaire des neurones dopaminocetifs et le contrôle des réponses émotionnelles, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

14256 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer le métabolisme de différents candidats médicaments chez le rat, et principalement leurs principales voies d'élimination que sont la voie rénale, la voie hépatique et la voie gastro-intestinale. Parallèlement à cela, l'évaluation de la toxicité des candidats médicaments sur ces différentes voies d'élimination pourra être étudiée. Pour cela, des recueils d'urine, de selles, de biles et de sang seront réalisés s à des intervalles de temps définis après administration du composé à tester.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 800 rats sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) qui permettent d'évaluer de manière parallèle et intégrée les différentes voies d'élimination mise en jeu lors de l'élimination d'une nouvelle molécule. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité, du métabolisme et de la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rongeur et principalement le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude pour l'évaluation précoce du métabolisme et de la toxicité d'un candidat médicament au cours de son développement.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le suivi d'éventuel signes cliniques
- la recherche des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

14257 Nos travaux de recherche s'intéressent à l'endothélium vasculaire, monocouche de cellules en contact avec le sang, capables de libérer dans le sang et dans la paroi du vaisseau de nombreux médiateurs qui contrôlent la vasomotricité, l'inflammation ou encore l'hémostase. La dysfonction endothéliale (DE) est l'anomalie fonctionnelle vasculaire qui sous-tend les complications cardiovasculaires (CV) associées à de nombreuses pathologies (telles que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, l'insuffisance rénale). Notre projet a pour objectif de caractériser et de comprendre les mécanismes impliqués dans cette anomalie vasculaire afin d'identifier les meilleurs traitements adaptés.

Une première partie de notre projet s'intéresse à la DE associée à la plus fréquente des maladies articulaires chroniques, la polyarthrite rhumatoïde (PR). Alors que les atteintes articulaires associées à la PR sont bien caractérisées, il est moins connu que les patients présentent une réduction de l'espérance de vie en raison de la survenue pathologies CV. L'existence d'une DE en cas de PR a été mise en évidence il y a 10 ans mais ses mécanismes physiopathologiques et ses traitements sont mal connus. Pourtant, il est admis que le traitement de la DE pourrait prévenir la

mordi-mortalité du patient PR. Aussi, notre projet a pour objectif de répondre aux questions suivantes : a quel moment apparaît la DE au cours de la maladie ? Quel territoire vasculaire faut-il cibler pour un diagnostic précoce de cette DE ? Est-ce que les traitements actuels de la PR sont suffisants pour traiter la DE ? Faut-il utiliser en cas de PR des traitements spécifiques de la DE ? Si oui, lesquels ?

Une deuxième partie de notre projet, vise à comprendre le lien entre fonction endothéliale et santé cérébrale. Nos travaux s'intéressent au "Brain-derived neurotrophic factor" (BDNF), une neurotrophine bien connue au niveau neuronal pour ses effets promoteurs de la plasticité cérébrale. Il a été récemment montré chez le Rat que l'endothélium vasculaire exprimait du BDNF. Nous émettons l'hypothèse que ce BDNF endothélial est un acteur de la fonction endothéliale périphérique et cérébrale, et de la santé cérébrale. L'objectif du présent projet sera de déterminer s'il existe un lien entre la fonction/DE, l'expression endothéliale du BDNF et ses concentrations circulantes.

Les réponses à ces questions nécessitent la mise en oeuvre d'études qui passent nécessairement par l'utilisation d'un modèle animal, seul modèle capable de mimer les interactions complexes entre l'inflammation articulaire, l'inflammation systémique, la fonction endothéliale et l'expression de médiateurs endothéliaux. Nos travaux sont conduits sur le modèle d'arthrite induite à adjuvant chez le Rat, modèle de référence pour mimer la PR, sur lequel l'existence d'une DE a été montrée, et/ou sur le modèle d'arthrite induite à Pristane qui produit du Facteur Rhumatoïde, auto-anticorps associé à un moins bon pronostic cardiovasculaire. Nos travaux concernant le BDNF seront effectués chez des rats soumis à une activité physique pour stimuler la fonction endothéliale (Marche sur tapis roulant), sur des rats hypertendus comme modèle de DE ou sur des souris transgéniques n'exprimant pas de BDNF endothélial. Pour chaque partie du projet, nous veillerons à utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire. Pour les modèles pouvant générer une douleur, un soin particulier sera apporté aux animaux lors de la manipulation et la détermination de points limites adaptés conduisant à la mise à mort de l'animal le cas échéant est prévue afin de limiter la souffrance. Un raffinement sera apporté à chaque procédure afin de limiter le stress des animaux, et le recours à une anesthésie profonde est prévu si nécessaire. Le projet prévoit 3832 rats ou souris sur 5 ans.

14258 L'hématose est un principe physiologique élémentaire qui permet la transformation du sang veineux (faible en dioxygène et riche en dioxyde de carbone) en sang artériel par ré-oxygénation au niveau pulmonaire. Ce processus nécessite trois conditions : 1/ une circulation de l'air (ventilation) ; 2/ un lieu d'échange (membrane alvéolo-capillaire dans les poumons) ; 3/ une circulation sanguine (perfusion). Tout processus pathologique entravant l'un de ces éléments entraîne une perturbation de l'hématose. Le rapport ventilation-perfusion (V/Q) est utilisé pour évaluer l'adéquation entre ces deux variables.

Différentes anomalies de ce rapport V/Q sont décrites en physiopathologie. On parle d'effet shunt lorsque certaines entités pulmonaires sont perfusées normalement mais mal ventilées (obstacle bronchique ou comblement alvéolaire). On parle d'effet espace mort lorsque que la ventilation est normalement assurée mais que la perfusion est atteinte (embolie pulmonaire, insuffisance circulatoire).

Ces situations sont très fréquentes en clinique courante, particulièrement en per et péri-opératoire et en situation de réanimation. L'évaluation du shunt et de l'espace mort reste difficilement quantifiable instantanément avec les outils actuels.

Le but de ce projet est d'évaluer un prototype de moniteur permettant de quantifier les paramètres du rapport V/Q. Ce prototype est basé sur l'analyse des gaz expirés et de l'inhalation intermittente de gaz inertes (N₂O et CO₂). Il est nécessaire de tester ce prototype dans différentes situations physiopathologiques (hyper-débit cardiaque, bas-débit cardiaque, shunt majoré, espace mort majoré, arrêt cardiaque et réanimation de l'arrêt cardiaque). Il n'existe actuellement aucun outil de mesure instantanée de l'espace mort et du shunt. Le modèle développé chez l'animal reproduit un

état très proche de l'état observé en clinique qui ne peut être reproduit qu'*in vivo* sur un organisme entier

Le porc est le modèle animal utilisé pour sa similitude avérée avec les processus physiologiques et physiopathologiques rencontrés en clinique chez l'humain. Ce projet utilisera des animaux, sous anesthésie générale et ventilés mécaniquement. Les différentes situations physio-pathologiques étudiées seront créées successivement par l'utilisation de traitement intra-veineux, par obstruction de l'artère pulmonaire par un dispositif endovasculaire et par circulation extracorporelle.

Ce projet utilisera 20 cochons permettant ainsi une étude statistiquement exploitable. Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique.

Les résultats de ce projet seront une première approche dans la compréhension fine des modifications du rapport V/Q dans les situations extrêmes rencontrées au quotidien en réanimation et au bloc opératoire. A terme l'utilisation de ce prototype en pratique clinique pourrait permettre une optimisation des prises en charge des patients.

14259 La vasorine (Vasn) est une protéine impliquée dans plusieurs voies de signalisation cellulaire impliquées dans le développement.

Cette protéine pourrait être impliquée dans des syndromes néphrotiques rares ou acquis, dans des troubles osseux ou plus généralement dans les maladies cardiovasculaires. Initialement étudiée dans le développement, la vasorine est exprimée chez la souris adulte dans de nombreux tissus, notamment les artères, les os, les dents et les reins.

En ce qui concerne le remodelage osseux, la génération de souris invalidées pour le gène *Vasn* n'a fourni que peu d'informations sur les fonctions de ce gène car les souris meurent à environ 21 jours.

Afin de mieux comprendre le rôle de vasorine dans le remodelage osseux nous utiliserons dès lors des souris adultes (3 mois) dans lesquelles le gène peut être inactivé spécifiquement par induction après traitement au tamoxifène. Pour ce faire, les souris recevront 5 injections de tamoxifène sur 5 jours (ou pas d'injections = contrôle).

Nous réaliserons sur différents groupes témoins ou groupes d'étude, deux prélèvements sanguins : un avant délétion du gène vasorine et l'autre avant la mise à mort des souris. Les urines des souris seront recueillies dans des cages métaboliques ce qui nous permettra d'étudier les marqueurs osseux de formation et de dégradation.

Par ailleurs, pour étudier la micro architecture osseuse des souris, des analyses des examens par micro-scanner seront effectués sur les animaux vivants avant et après l'injection du tamoxifène.

Le projet est prévu sur 5 ans et prévoit l'utilisation d'au maximum 60 souris. Le nombre de souris utilisées par expérience sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables

Afin de respecter la règle des 3R, vasorine ayant un rôle très complexe et étant exprimée dans de nombreux tissus les études *in silico* ou *in vitro* ne peuvent à l'heure actuelle répondre aux questions fondamentales et l'utilisation de modèles animaux reste indispensable. Les animaux seront placés dans un environnement enrichi répondant aux normes établies et seront surveillés pendant toute la durée de l'étude par un suivi pluri-hebdomadaire basé sur des points limites bien définis, entraînant si nécessaire, la mise à mort anticipée de l'animal. Les animaux seront mis à mort avant que l'insuffisance rénale n'entraîne par elle-même une altération importante de leurs des conditions de vie (difficultés à se déplacer ou à atteindre la nourriture.). De plus pour des questions de bien-être animal (éviter le stress) les souris passées au scanner seront endormies par anesthésie légère gazeuse.

L'ensemble de ce projet devrait permettre d'identifier plus clairement le rôle de la Vasorine dans le remodelage osseux et par la suite de pouvoir évaluer le rôle potentiel de la Vasorine dans des pathologies humaines présentant une forte résorption osseuse.

14260 La résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces en santé humaine à l'échelle mondiale. En effet, un nombre croissant d'infections bactériennes deviennent de plus en plus difficiles à traiter car l'antibiothérapie n'est plus efficace lorsque l'agent pathogène responsable de l'infection est multi-résistant. Depuis plusieurs années, les organisations internationales de santé soulignent le besoin de développer de nouvelles stratégies antimicrobiennes afin de pouvoir continuer à lutter efficacement contre les infections bactériennes chez l'homme. Dans ce contexte, notre projet vise à évaluer une nouvelle approche antimicrobienne innovante permettant d'éradiquer spécifiquement un agent pathogène ciblé. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une souche bactérienne capable de transférer par conjugaison un plasmide conduisant à la mort de l'agent pathogène. Cette nouvelle méthode a été validée *in vitro* en utilisant des cultures bactériennes pures ainsi que des mélanges de souches. L'étape suivante est désormais d'évaluer l'efficacité de cette méthode *in vivo* lors d'infections expérimentales d'animaux. Le modèle choisi est basé sur l'infection de souris par la bactérie *Citrobacter rodentium*, un agent pathogène naturel de souris responsable d'infections intestinales inflammatoires.

Nous estimons que 160 animaux seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 2 ans. En accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE, les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) seront les suivantes :

- « Remplacer » les modèles animaux: Les études *in vitro* en condition de laboratoire ont d'ores et déjà été effectuées et ont permis de valider l'efficacité de cette nouvelle approche antimicrobienne. Dans une optique de développement de nouvelles stratégies anti-infection, il est indispensable d'avoir recours aux animaux pour observer l'efficacité du traitement dans un organisme entier afin de prendre en compte la complexité du système qui intègre à la fois la réponse immunitaire, la structure du tractus digestif ainsi que la présence du microbiote intestinal. Il n'existe pas de modèles cellulaires reproduisant la complexité de ces interactions.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux différentes questions scientifiques à la fois pour garder une puissance statistique suffisante dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'exclusion de certains animaux au cours de l'expérimentation. Il s'agit d'un nombre d'animaux maximal qui sera revu à la baisse en fonction des premiers résultats obtenus qui pourront dans certains cas ne pas nécessiter de répétitions pour valider les observations.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites justifiant la sortie d'animaux au cours du protocole expérimental. L'ensemble des animaux seront suivis quotidiennement par du personnel qualifié afin d'identifier l'apparition de signes de souffrances caractérisés par une perte de poids trop prononcée, un état du pelage altéré ou encore un comportement inadapté des souris (isolement, tremblement, ataxie). Si les points limites tels que définis dans le projet sont atteints, les animaux seront immédiatement sortis du protocole expérimental et euthanasiés selon la réglementation en vigueur.

14261 Un gène a récemment été impliqué dans une forme nouvelle de surdité neurosensorielle associée à une atteinte oculaire (Amaurose congénitale de Leber). Les patients affectés souffrent d'une surdité neurosensorielle bilatérale modérée, à transmission dominante et d'apparition précoce. Ce gène code pour une protéine du cytosquelette dont le rôle dans l'audition est inconnu à ce jour

Ce projet vise à étudier la fonction de cette protéine du cytosquelette dans l'audition et de déterminer comment les mutations identifiées induisent une surdité chez l'homme. Il n'existe actuellement pas de modèle cellulaire satisfaisant permettant l'étude des gènes de l'audition. Pour cette raison des modèles animaux, souris et poisson zèbre, exprimant une protéine porteuse de la mutation identifiée chez l'homme, seront générés.

Lors de la génération du modèle murin, les étapes préliminaires à l'édition du génome seront réalisées sur des cellules en culture afin de restreindre le recours à l'animal aux étapes où cela est strictement nécessaire.

L'audition et l'activité de l'oreille interne seront analysés chez les souris par mesure de l'activité électrique des voies nerveuses auditives de l'oreille et du cerveau et analyse des produits de distorsion acoustique auditifs par audiogramme.

L'audition des poissons sera étudiée par une méthode non-invasive d'analyse du comportement de nage de l'animal suite à l'émission d'un son par un haut-parleur : l'observation et le suivi de la nage seront effectués par caméra vidéo en faisant varier intensité et fréquence sonore.

La surdité humaine liée à des mutations de cette protéine étant progressive, ces mesures seront réalisées au cours de la vie des animaux (4-39 semaines chez la souris et 5 jours-1 an chez le poisson). Les valeurs obtenues chez les animaux porteurs de la protéine mutée seront comparées aux valeurs mesurées chez les animaux contrôles.

La morphologie de l'oreille interne et des cellules qui la composent seront étudiées par microscopie optique, par microscopie à fluorescence et par microscopie électronique sur des oreilles prélevées post-mortem.

Ainsi, la localisation de la protéine du cytosquelette et des différentes protéines avec lesquelles elle interagit seront analysées en post mortem sur des coupes d'oreille de souris aux stades E16 - P30 et in toto sur des larves de poisson zèbre de moins de 5 jours.

D'autre part, les éventuels changements de localisation de la protéine mutée seront suivis *in vivo*, par microscopie de fluorescence, sur des poissons de moins de 5 jours exprimant la protéine (sauvage ou mutée) dans sa forme étiquetée avec la protéine fluorescente EGFP. Ces observations *in vivo* par microscopie de fluorescence ne peuvent pas être réalisées chez la souris.

Les expérimentations sur l'animal seront réalisées en respectant la règle des 3R, dans le respect du bien-être animal.

Pour se placer dans un contexte de raffinement adapté, la réimplantation sera réalisée sous anesthésie générale sur une surface chauffante chez la souris et un analgésique sera administré. Chez le poisson les expériences ne sont pas douloureuses.

Ce projet d'une durée de 3 ans nécessitera 731 animaux, en majorité des poissons zèbre (550) mais aussi 181 souris.

Le nombre important de poissons zèbre requis est lié à la faible efficacité de la génération des modèles Knock-In à l'heure actuelle. Une veille bibliographique sera réalisée afin de suivre toute évolution technologique permettant la réduction du nombre d'animaux utilisés.

L'identification des mécanismes moléculaires responsables de cette maladie rare devrait fournir de nouvelles connaissances sur la fonction de cette protéine du cytosquelette dans l'audition et sur le rôle de mutations spécifiques de la protéine dans la survenue d'une nouvelle forme de surdité neurosensorielle associée à une amaurose congénitale de Leber.

14262 Ce projet de recherche concerne le développement de stratégies thérapeutiques innovantes non-invasives applicables à des pathologies d'origine traumatique dont aucun traitement à ce jour n'est disponible. Les lésions de la moelle épinière au niveau cervical sont relativement fréquentes chez l'homme, entraînant des problèmes au niveau locomoteur ainsi qu'au niveau du contrôle neural de l'activité respiratoire et cardio-vasculaire, représentant ainsi la première cause de mortalité chez les patients. Une restauration partielle spontanée de l'activité respiratoire, cardiovasculaire ainsi que locomotrice peut être observée après lésion incomplète au niveau cervical, principalement due à une réorganisation des projections synaptiques épargnées. Cette restauration fonctionnelle est relativement faible, il devient nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques innovantes en vue d'améliorer les activités motrices perdues chez les patients et d'éliminer l'assistance mécanique ventilatoire. Plus particulièrement, nous nous focalisons sur le développement et l'étude de traitements visant à améliorer la fonction respiratoire et cardiovasculaire après traumatisme de la moelle épinière en cervical.

Nous utilisons un modèle *in vivo* de lésion spinale cervicale chez la souris. Ce modèle est reproductible et limite le nombre d'individus requis pour obtenir des résultats statistiquement probants.

Les techniques que nous développons sur ce modèle sont de deux ordres :

- Une approche pharmacologique pour modifier le métabolisme énergétique et induire des réponses moléculaires bénéfiques pour la restauration des fonctions atteintes et
- la neuromodulation non-invasive par rTMS (stimulation magnétique transcrânienne) des neurones du cerveau et de la moelle épinière en vue d'améliorer le contrôle neuronal des fonctions ventilatoires et cardiovasculaires.

Afin de limiter le nombre d'individus, et dans le strict respect de la règle des 3R, nous utilisons des outils de diagnostic non-invasifs et non restreints, comme la pléthysmographie et l'échocardiographie doppler, afin d'avoir un suivi du même individu au cours du temps. Un suivi quotidien des animaux ainsi qu'un contrôle de la douleur sera pris en compte en utilisant des antidouleurs en chronique. De plus, nous incluons nos animaux dans différentes procédures expérimentales légères afin de réduire le nombre d'animaux en évitant l'utilisation de divers groupes distincts lors des études temporelles. Un nombre total de 1150 animaux sur les 5 années du projet sont nécessaire à sa réalisation. Une connaissance de l'application de ces divers traitements ainsi que de l'efficacité de ceux-ci permettront une meilleure compréhension de leur efficacité, et pourraient aboutir à l'élaboration d'un traitement pour les patients souffrant de traumatismes spinaux.

14263 Dans les pays industrialisés, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) affecte 10% des patients admis en réanimation médicale, avec un taux de mortalité atteignant 30% à 50%. Ce syndrome est une forme grave d'insuffisance respiratoire aiguë, associée à une inflammation épithéliale sévère et un œdème pulmonaire. Il conduit à une réduction de la compliance pulmonaire et à une déficience des échanges gazeux. Le traitement actuel repose sur l'assistance ventilatoire des patients avec de faibles volumes inspiratoires pour limiter l'étirement des alvéoles. En revanche, cette approche ne suffit pas est délétère en cas de SDRA très sévère qui nécessite de forts volumes inspiratoires pour une oxygénation optimale. Afin d'améliorer cette prise en charge, nous proposons d'étudier une autre stratégie de gestion des échanges gazeux par une assistance circulatoire extracorporelle (ACE), qui permet l'oxygénation et la décarboxylation extraporeselles du sang par membranes spécifiques. Cependant, l'ACE peut aussi être délétère par des effets pro-inflammatoires à court terme lors de sa mise en place. Nous proposons donc d'étudier le rôle de la balance inflammatoire lors d'un SDRA traité par ACE, afin d'évaluer le moment optimal de sa mise en place pour limiter l'inflammation liée au SDRA. Pour ce faire, nous étudierons plus spécifiquement le rôle d'un médiateur inflammatoire précoce : la High mobility group box 1 (HMGB1). Ce phénomène sera étudié dans un modèle expérimental de SDRA déjà validé au sein du laboratoire chez 170 lapins profondément anesthésiés, en comparant différentes conditions expérimentales de mise en place de l'ACE et différents paramètres ventilatoires. Compte tenu de la nature des maladies étudiées et de l'évaluation d'approche thérapeutique « intégrée », il n'est pas possible de mimer cette situation *in vitro* (absence de Remplacement possible). Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). Enfin, le protocole expérimental a été conçu de façon à lutter contre toute forme de souffrance (animaux anesthésiés sous antalgiques) et les conditions d'hébergement sont aux normes en vigueur (Raffinement).

14264 L'oxygène est un élément clé durant la phase d'ischémie-reperfusion et son absence est responsable de dommages cellulaires et tissulaires. Ces derniers sont à l'origine du dysfonctionnement du greffon rénal, et par la suite d'une reprise de fonction retardée ou insuffisante qui peut aboutir à la perte du greffon. Alors que l'oxygène est indispensable à 37°C, plusieurs études ont démontré que la présence d'oxygène pendant la phase de préservation à froid joue également un rôle crucial dans le devenir du greffon (foie, rein.).

Dans cette étude exploratoire, nous nous proposons d'étudier l'impact de la pré-charge en oxygène de la solution de préservation en machine de perfusion.

L'étude est constituée de deux phases, l'une *ex vivo* (PHASE-EX-VIVO), l'autre *in vivo* (PHASE-IN-VIVO).

Pour ce travail, nous utiliserons un modèle rénal porcin, i) rein isolé préservé sur machine pour la PHASE-EX-VIVO, ii) autotransplantation pour la PHASE-IN-VIVO. Ce modèle porcine a été établi, validé et mis au point dans notre laboratoire depuis plusieurs années et permet de répondre à la règle des 3R:

D'une part, en limitant considérablement la perte d'animaux pré et post-opératoire par l'intervention de praticiens/chirurgiens expérimentés assurant une utilisation éthique et optimale des animaux (modélisation des situations cliniques humaines en terme « médicaux » réalistes, anesthésie, chirurgie. =>3R (Réduction).

D'autre part, en prenant en charge les animaux avec un suivi pré et post-opératoire (prises de sang, mise en cages métaboliques individuelles situées dans un local maintenu à température de confort, mise à disposition d'eau et de nourriture). De même, une application médicamenteuse est réalisée (si nécessaire) afin de diminuer au maximum la douleur (/mal-être) de l'animal (administration d'anesthésiques-analgésiques) => 3R Raffinement

La transplantation d'organes n'est évidemment modélisable que sur un organisme vivant. Par conséquent, 3R-Remplacement ne peut pas s'appliquer à ce type de projet.

Les animaux utilisés sont des Porcs mâles âgés de 3 mois. Pour la PHASE-EX-VIVO, nous utiliserons un effectif de 10 animaux (2 groupes, 5 animaux par groupe). Pour la PHASE-IN-VIVO, nous utiliserons un effectif de 12 animaux (2 groupes, 6 animaux par groupe). L'effectif total de cette étude sera de N=22 animaux.

Pour la PHASE-EX-VIVO : Les deux reins de chaque animal seront utilisés, l'un comme Témoin (solution de préservation, pré-équilibrée avec l'atmosphère, Oxygène 20%), l'autre comme Test (PRECHARGE = pré-équilibration de la solution de préservation avec oxygène pur, Oxygène 100%). Durant la phase de perfusion machine, l'oxygène de la solution de préservation sera mesuré et la consommation d'oxygène sera calculée.

Pour la PHASE-IN-VIVO : Pour chaque animal, le rein destiné à être autotransplanté subira une ischémie chaude de 60 min (mimant ainsi les donneurs de type "DCD", ou "donneurs après arrêt circulatoire"), puis sera conservé en machine, à froid (4°C), pendant 24h, avec ou non une pré-charge en oxygène de la solution de conservation. L'auto-transplantation du greffon conservé sera réalisée chez l'animal, avec une néphrectomie contralatérale (les reins contralatéraux seront utilisés comme "témoins" : banc de perfusion normothermique, histologie/anatomo-pathologie, analyses protéomiques). Le suivi post-opératoire des animaux transplantés sera de 3 mois, durée optimale permettant de juger à la fois de la reprise immédiate de fonction, et du devenir à long-terme de l'organe greffé.

La comparaison des deux groupes expérimentaux fournira de précieuses informations sur l'effet, potentiellement bénéfique, de la précharge en oxygène et le devenir du greffon rénal après transplantation.

14265 Dans ce projet nous développons une formulation capable de délivrer des antigènes de mélanome sous forme d'ARN *in vivo* avec induction d'une réponse immune spécifique et protectrice.

Les formulations utilisées jusqu'ici dans l'équipe permettent l'induction d'une réponse protectrice contre le mélanome.

Il y a 10 000 nouveaux cas de mélanome par an en France.

Cependant, la protection observée contre la croissance de tumeurs exigeait l'administration d'une dose d'ARN élevée par rapport aux essais cliniques en cours avec des vaccins ARN contre le cancer.

En effet, la majeure partie de l'ARN injecté est soit dégradé dans le sang soit dégradé dans les vésicules intracellulaires après internalisation par les cellules immunitaires.

Pour améliorer l'efficacité de notre formulation (désignée lipopolyplexes), nous allons utiliser un traitement avec la drogue antipaludique chloroquine (utilisées chez l'Homme) qui promeut l'échappement endosomal.

L'étude qui fait l'objet de cette demande d'autorisation a pour but d'augmenter l'activité du vaccin lipopolyplexes ARN en le combinant avec la chloroquine.

Les avantages liés à ce projet sont l'évaluation de nouveaux adjuvants pour la vaccination ARN contre le cancer.

Nos travaux seront menés dans le respect de la règle des 3R : l'effectif des souris mis en œuvre est limité au strict minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement.

Nous avons déjà effectué des travaux in cellulo préalables sur des cellules immunitaires de souris traitées avec des lipopolyplexes ARN +chloroquine.

Les travaux chez le modèle animal sont dans la continuité de ces résultats.

Ce projet permettra d'augmenter les vaccins par ARN existants, il permettra aussi d'en diminuer les doses ce qui permettra à terme de démocratiser ce type de vaccins dont les coûts sont de nos jours compris entre 20 000 et 100 000 euros par patient.

Les animaux seront anesthésiés durant la procédure.

Les animaux seront surveillés quotidiennement dès leur arrivée au laboratoire avec une grille de scoring et des points limites adaptés et recevront un analgésique en cas de douleur.

Il y a deux procédures: 1) évaluer l'impact de l'injection de la chloroquine avant injection des lipopolyplexes ARN sur l'expression du gène rapporteur, 2) évaluer l'impact du traitement à la chloroquine sur la vaccination anti-mélanome.

Deux voies d'injection seront employées: intraveineuse et intramusculaire. Nous utiliserons trois lipopolyplexes différents et deux types d'ARN (ARN messenger et ARN auto-répliquatif). Des groupes de 5 souris sont prévus avec un lot de souris non traitées.

La procédure 1 consiste à quantifier le pourcentage de cellules immunitaires exprimant l'ARN pour sélectionner la formulation permettant la plus forte expression du gène rapporteur pour l'ARN messenger et pour l'ARN auto-répliquatif.

Dans la procédure 2, nous évaluerons l'effet de la chloroquine sur l'activité du vaccin ARN sera évaluée dans un modèle souris de mélanome B16F10 en utilisant une seule formulation pour l'ARN messenger et une formulation pour l'ARN auto-répliquatif.

La procédure 1 comprendra 6 lot de 5 souris injectées + un lot contrôle par voie d'injection donc $6*5+5 * 2 = 70$ souris.

La procédure 2 comprendra 4 lots de 5 souris vaccinées soit $4*5 = 20 * 2$ types d'ARN = $40 * 2$ voies d'injection = 80. A ceci s'ajoutent deux lots contrôles donc 90 animaux.

Le total est de 160 animaux.

14266 L'objectif de ce projet est de développer des stratégies thérapeutiques pour traiter une maladie métabolique rare d'origine génétique, causée par la dysfonction d'une enzyme.

La forme classique de cette maladie se caractérise par un coma en période néonatale pouvant conduire au décès en l'absence de traitement en urgence. Il existe également des formes moins sévères, chroniques, sans épisode aigu néonatal sévère et des formes se révélant par des troubles neurologiques lors d'épisodes aigus de stress métabolique (fièvre...).

A ce jour, le principal traitement repose sur un régime alimentaire extrêmement strict, limité en protéines. Ce régime est très efficace mais il doit être poursuivi à vie et ne permet pas de prévenir le risque de complications graves, parfois mortelles. Un tel régime altère de façon significative la qualité de vie. Certains patients peuvent bénéficier d'une transplantation hépatique qui certes guérit la maladie, mais demeure associée à un risque propre de rejet et de décès. L'efficacité de la transplantation hépatique dans cette maladie nous a conduit à proposer le projet ici présenté.

Notre objectif est de développer une stratégie de traitement de cette maladie métabolique par une approche de thérapie génique basée sur l'utilisation de virus adeno-associés (AAV), non-

pathogènes, qui ont montré qu'ils pouvaient corriger de manière stable des maladies où d'autres protéines sont manquantes après une seule administration. Nous utiliserons différents AAV modifiés pour apporter les gènes manquants au niveau des cellules du foie. Nous chercherons à apporter 2 gènes différents, responsables individuellement de la maladie chez l'homme quand mutés, afin de traiter à terme un maximum de patients. Nous devons démontrer l'efficacité de nos constructions pour chacun de ces gènes.

Afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux dans ce projet, 20 vecteurs AAV ont été préalablement testés sur des cellules de foie cultivées en laboratoire. Ceci nous a permis de sélectionner 10 traitements candidats. Cependant la capacité de nos virus à franchir les défenses immunitaires ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier". Nous prévoyons donc de les tester dans 3 modèles murins de cette maladie métabolique. Nous envisagerons deux stratégies thérapeutiques : traitement précoce dans les premiers jours de vie en cas de forme sévère ou traitement à 1,5 mois de vie en cas de phénotype modéré.

Toutefois, la seule utilisation de ces souches pose certains inconvénients : en sachant qu'un animal sur 4 est affecté par cette maladie à la naissance et compte-tenu du nombre de souris nécessaires pour notre projet, le nombre de souris en élevage serait trop important pour répondre à l'ensemble des questions posées. Aussi, dans l'optique de réduire au maximum l'utilisation de ces souris malades, nous testerons dans un premier temps nos vecteurs AAV chez une souche de souris saines (C57Bl/6). Ceci nous permettra de sélectionner ceux capables de produire la plus grande quantité d'enzyme fonctionnelle. Puis dans un second temps, les traitements sélectionnés seront testés chez les souris malades, afin de valider leur pouvoir thérapeutique.

Au total, 1432 souris seront utilisées sur une période de 3 ans. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'étude.

Nous allons utiliser des procédures de raffinement pour éviter la souffrance des souris lors de prélèvements sanguins et pendant l'injection du vecteur thérapeutique. Une surveillance régulière sera mise en place et des points limites adaptés ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les souris seront gardées dans des portoirs ventilés dans lesquels nous ajouterons du coton, une maisonnette et des bâtonnets à ronger. L'enrichissement social des souris sera garanti en évitant tout isolement prolongé.

14267 Chez l'Homme, la maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones produisant de la dopamine situés dans une région du cerveau appelée la substance noire. La dopamine est un neurotransmetteur essentiel pour le contrôle des mouvements volontaires et les apprentissages. Elle est produite à partir de la tyrosine qui est d'abord transformée dans le cerveau en L-DOPA puis en dopamine. La conversion de la L-DOPA en dopamine se fait grâce à une enzyme appelée la DOPA-décarboxylase (DDC). Le seul moyen actuel de soigner la maladie de Parkinson n'est pas curatif, il consiste à donner aux malades de la L-DOPA pour compenser l'absence de dopamine. Cela permet de traiter efficacement pendant un certain temps les symptômes moteurs de la maladie. Malheureusement, ce traitement chronique finit par provoquer l'apparition de complications motrices sévères sous forme de mouvements involontaires anormaux appelés dyskinésies, ce qui contrecarre le gain procuré par la L-DOPA et affecte beaucoup la qualité de vie des patients. De nouvelles voies thérapeutiques sont donc activement recherchées. Une de ces voies est de travailler sur l'hypothèse que plusieurs données suggèrent : la L-DOPA pourrait être un neurotransmetteur et aurait des effets indépendants de sa conversion en dopamine. Pour tester cette hypothèse, nous proposons de bloquer la synthèse de l'enzyme DDC dans les neurones dopaminergiques de la substance noire chez la souris afin qu'ils ne produisent plus de dopamine mais seulement de la L-DOPA. Notre stratégie expérimentale utilisera la technique de Sh-RNA pour inactiver le gène de la DDC dans la substance noire puis d'évaluer le comportement moteur des animaux. Afin d'étudier les caractéristiques de la libération et de la recapture de L-DOPA par les neurones dopaminergiques, des techniques d'ampérométrie continue (permettant de mesurer la L-DOPA et la dopamine) seront utilisées chez la souris anesthésiée. L'analyse des neurones sera ensuite effectuée sur le cerveau des animaux prélevés après leur mise à mort. L'analyse des effets sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux.

Ce projet utilisera 140 souris incluant les groupes expérimentaux et leurs contrôles et sera réalisé dans le respect de la règle des 3R, pour le R de remplacement, ces approches analysant le comportement de l'animal, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier. Pour le R de réduire le nombre d'animaux (i) nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux et réduit aux maximum le nombre d'animaux en planifiant uniquement des expériences absolument nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques, (ii) en effectuant des mesures répétées et un suivi longitudinal des animaux, (iii) en utilisant des tests statistiques performants : ANOVA multi factorielle suivi de tests "post-hoc" de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur. De plus nous avons en amont validé la capacité du shRNA à inhiber la synthèse de la DDC *in vitro* sur cellules en cultures (NIH3T3). Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée actuelle n'indique que l'inactivation de la DDC soit susceptible d'entraîner une souffrance chez les animaux, et nous utilisons des tests comportementaux faisant appel au comportement spontané de l'animal afin de limiter l'anxiété et le stress. Toutes les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées par les molécules les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

14268 Malgré des progrès remarquables en matière de prévention et de traitement, le cancer reste une cause majeure de mortalité dans le monde. Depuis quelques années, notre groupe est spécialisé dans le développement de stratégies de chimiothérapies sélectives ciblant les cellules tumorales. Les vecteurs anticancéreux que nous développons véhiculent un médicament vers la tumeur sous une forme non-toxique. Dans ce contexte, nous avons développé des agents anticancéreux capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral ou de récepteurs présents à la surface des cellules tumorales. Ces stratégies ont été validées *in vitro* sur des cellules en culture mais aussi *in vivo* chez des souris. Dans ce projet, nous souhaitons administrer chez la souris de nouvelles générations d'agents anticancéreux vectorisés et déterminer leur toxicité. Ces données permettront d'établir la meilleure posologie pour inclure en toute sécurité ces nouveaux médicaments dans un protocole thérapeutique.

Pour mener à bien cette étude, nous réaliserons une seule procédure expérimentale pour un total de 120 souris. La stratégie de transport de la doxorubicine par notre transporteur chimique a déjà été validée *in vitro* sur des modèles de culture cellulaire. Afin de connaître le potentiel de cette stratégie, il est à présent obligatoire de transposer ce concept sur des modèles animaux. Afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Une grille d'évaluation des signes cliniques sera réalisée pour chaque individu de l'étude afin de suivre le plus précisément possible l'évolution de son état de santé. Afin de pouvoir étudier notre stratégie thérapeutique chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer). Comme mentionné plus haut, la stratégie de ciblage des tumeurs a déjà été validée par notre laboratoire lors d'études préliminaires. Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. La « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 3 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner).

14269 Nous déterminerons le rôle de 7 métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'équilibre glycémique et du poids corporel. Des métabolites dérivés de la flore intestinale ont été associés au diabète et à l'obésité chez l'Homme et dans des modèles expérimentaux chez le rat et la souris par analyse de données de métabolomiques. Nous testerons l'impact d'une supplémentation chronique de ces métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'homéostasie glucidique chez la souris ou le rat. La supplémentation s'effectuera *in vivo* par implantation sous cutanée d'une pompe osmotique, qui permet de libérer

une solution contenant un métabolite d'intérêt de manière chronique (6 semaines). L'implantation de ces pompes se fera sous anesthésie générale. Les animaux se verront administrer un analgésique pour diminuer leur douleur et ils seront suivis quotidiennement. Concernant la règle des 3R, le projet a été initialement entrepris *in vitro* sur des lignées cellulaires. Toutefois le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissus producteurs et cibles de l'insuline, qui rend indispensable des explorations *in vivo* chez l'animal entier. La réduction est prise en compte, n=8 est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA. Nous passerons le plus de métabolites en parallèle pour réduire le nombre d'animaux des groupes contrôles. En ce qui concerne le raffinement, l'utilisation de pompes osmotiques remplace les injections i. p. ou sous cutanées quotidiennes et réduit donc le stress que représente la contention nécessaire aux injections sur des périodes prolongées. Le volume libéré par les pompes est beaucoup plus faible que lors d'une injection, puisqu'il diffuse au cours de la journée, et la pompe contient un volume nécessaire pour un traitement chronique sur 6 semaines. Au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux. Nous utiliserons 112 souris C57Bl6 et 32 rats.

14270 La pullorose et la typhose aviaire sont des maladies infectieuses dues à *Salmonella enterica enterica serovar Gallinarum* (biovar Pullorum ou Gallinarum respectivement). Ces maladies septicémiques affectent principalement les poussins, les jeunes dindonneaux et faisandeaux, et sont responsables d'une mortalité en coquille ou après l'éclosion.

La maladie est moins grave chez les oiseaux plus âgés, mais il peut y avoir une réduction de la production d'œufs, des troubles de l'éclosion et un certain accroissement de la mortalité. Dans le cas de *Salmonella Gallinarum* biovar Pullorum, bien que la mortalité puisse être élevée, les signes cliniques sont rares chez les adultes.

L'importance de ces maladies est principalement économique surtout en filière *Gallus gallus* (la mortalité dans un élevage infecté peut atteindre 50 à 100 % des embryons et des poussins). Elles n'ont pas d'incidence significative en santé publique et sont actuellement classées comme danger sanitaire de 2e catégorie, mais elles restent néanmoins réglementées (leur déclaration au préfet est obligatoire et elles sont soumises à des mesures de police sanitaire).

Ce projet a pour objectif de produire des sérums positifs de référence pour la technique d'agglutination rapide sur lame (NF U47-034) grâce à une infection expérimentale de poulets par *Salmonella Gallinarum*. Le protocole consistera dans un premier temps en une infection par voie intramusculaire de poulets exempt d'organisme pathogène spécifique (40 poulets EOPS) par une souche de *Salmonella Gallinarum*. Puis, dans un second temps, en un suivi régulier de la réponse sérologique des animaux infectés (prises de sang) et une mise à mort des animaux pour récolter le sang lorsqu'ils auront développé une réponse immunitaire sérique spécifique de la souche de *Salmonella Gallinarum* inoculée. Ces sérums ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur espèces cibles. Le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des volumes de sérum suffisants pour constituer des stocks sur 3 à 5 ans et éviter de multiplier les essais.

Le protocole expérimental est conçu pour limiter autant que possible le stress et la souffrance animale, en limitant les interventions sur animaux. Les phases de stress et de douleur légère générées par l'inoculation de la souche de *Salmonella Gallinarum* et par les prélèvements réalisés sur les animaux (prises de sang), seront directement liées à l'acte de piqure qui est subie par l'animal, par conséquent aucun protocole de médication particulière n'est prévu. Les poulets seront logés dans un bâtiment confiné pour volailles en respectant les normes du bien-être animal et avec à disposition des enrichissements appropriés. Une mise à mort compassionnelle sera pratiquée si l'un des signes cliniques suivants est observé: blessure grave, prostration, absence de réaction après sollicitation sonore ou visuelle, anorexie ou impossibilité de s'abreuver ou de s'alimenter.

14271 Les infections par les nématodes gastro-intestinaux constituent une menace pour la santé et la productivité des petits ruminants conduits en extérieur, avec des multi-résistances aux anthelminthiques de synthèse observées à l'échelle globale. Parmi les alternatives agro-

écologiques explorées pour contrecarrer ce problème, les ressources alimentaires contenant des tanins condensés (TC) apparaissent prometteuses. Les travaux récents sur les effets antiparasitaires du sainfoin, une légumineuse fourragère contenant des TC, ont montré que ses teneurs modérées en TC peuvent être limitantes lorsqu'il est inclus dans des rations ou des mélanges fourragers. De nouvelles ressources riches en TC comme des co-produits de l'agro-industrie pourraient être utilisées comme complément dans l'alimentation des animaux pour enrichir la ration en ces composés bioactifs. Dans ce contexte, les peaux de châtaignes extraites par des procédés thermiques pourraient être incluses dans la ration soit directement, soit en association avec du sainfoin pour optimiser les effets bénéfiques des TC. La valorisation de co-produits issus de l'agro-industrie répond en outre au développement de la bio-économie circulaire.

En plus de leurs effets antiparasitaires, les TC ont la propriété de former des complexes avec les protéines, ce qui a pour effet de protéger celles-ci d'une dégradation excessive par les protéases végétales et par les microorganismes protéolytiques du rumen. Lorsque la teneur en protéines de la ration n'est pas limitante, ce mécanisme permet de diminuer la production d'ammoniaque en excès qui est à l'origine de l'excrétion azotée dans les urines. Cela représente à la fois une perte azotée pour le ruminant et un rejet polluant qui impacte par lixiviation la qualité des eaux, et par volatilisation la production de protoxyde d'azote. Le protoxyde d'azote est un gaz à effet de serre dont le pouvoir réchauffant est 298 fois supérieur au CO₂ sur 100 ans. Les TC présentent également le potentiel de diminuer les émissions d'un autre gaz à effet de serre majeur, le méthane (CH₄) entérique produit lors des fermentation ruminales.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'ingestion et la digestion de régimes contenant des prototypes d'aliments à base de ressources riches en TC : 1) granulés à base de peaux de châtaigne, 2) granulés de sainfoin et 3) granulés de sainfoin + châtaigne) chez des agneaux en croissance. Environ 500 g de granulés seront distribués quotidiennement en complément d'un régime à base d'herbe. Des mesures d'émissions de méthane entérique, de bilan azoté et de qualité de la viande seront également réalisées. Les animaux seront abattus et un certain nombre de mesures et de prélèvements seront réalisés pour étudier les effets des rations sur la qualité de la viande, notamment sa teneur en acides gras poly-insaturés et sa stabilité oxydative.

Ce projet répond ainsi à l'objectif d'amélioration des techniques et conduites d'élevage pour la performance économique des élevages sous l'angle alimentaire et de la qualité des produits animaux, et à celui de la performance environnementale avec des approches en lien avec la réduction des impacts climatiques.

Quatre lots de 8 jeunes agneaux seront constitués (3 lots essais et un lot contrôle). Les différences de réponses (ingestion, digestion, émissions de polluants) des agneaux aux régimes alimentaires seront évaluées par des mesures de prises alimentaires et des mesures de digestion en case à métabolisme et en chambre respiratoire. Compte-tenu de la variabilité interindividuelle de ces mesures, le nombre d'animaux nécessaire pour mettre en évidence une différence au moins égale à 2 fois la valeur de l'écart-type des fidélités intermédiaires des mesures est de 6 avec une probabilité de 0.05, et de 8 avec une probabilité de 0.01. Huit individus par groupe sont donc nécessaires à l'obtention d'une puissance statistique suffisante pour l'analyse des résultats. Au total, 32 animaux seront utilisés.

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet et de cette demande. Premièrement il n'est pas possible de remplacer l'animal dans cette étude car il n'existe pas de méthode alternative fiable pour valider nos objectifs scientifiques. Deuxièmement les effectifs animaux ont été limités et réduits au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats fiables (paragraphe précédent). Troisièmement, tout est mis en oeuvre pour raffiner les procédures expérimentales en utilisant par exemple un dispositif pour faire une partie des mesures de digestibilité directement dans les chambres respiratoires. De plus les animaux seront suivis quotidiennement pour s'assurer de la bonne santé des animaux.

14272 L'anévrisme intracrânien (AIC) est une anomalie cérébrovasculaire fréquente et généralement asymptomatique affectant environ 3 % de la population générale. En France, cela représente environ 2 millions de personnes. La complication dévastatrice de l'AIC est sa rupture et l'hémorragie

sous-arachnoïdienne qui en résulte. Bien que rare (10 sur 100 000 dans la population caucasienne) cette hémorragie est mortelle dans la moitié des cas ou laisse des séquelles neurologiques majeures.

Alors que l'évolution de la lésion anévrysmale est relativement bien décrite les mécanismes physiopathologiques sous-jacents sont encore mal connus. De par son caractère multifactoriel, la mise en place de modèles expérimentaux *in vivo* mimant l'AIC est essentielle pour mieux comprendre sa formation, son développement et sa rupture.

La souris est un animal chez lequel les manipulations génétiques de type transgénèse ou recombinaison homologue permettent de cibler un gène d'intérêt et de vérifier son rôle dans un mécanisme physiopathologique donné. Pour ce projet, nous allons utiliser un modèle mis en place et développé chez le rat et adapté à la souris. Ce modèle reproduit les caractéristiques structurales d'AIC. Il provoque une augmentation des contraintes hémodynamiques dans le réseau vasculaire cérébral grâce à une ligature de l'artère carotide commune, associée à une ligature bilatérale des branches postérieures des artères rénales et à un traitement hypertenseur sur 4 mois. Ces modifications conduiront, à terme, à une fragilisation de la paroi artérielle et à la formation d'AIC. Ce modèle nous permettra donc, sur différentes souris génétiquement modifiées, de pouvoir identifier si nos gènes candidats participent à la formation d'AIC (rôle répressif ou favorisant).

La mise au point (24 souris) et la validation de ce modèle (32 souris) nécessiteront l'utilisation de 56 souris au maximum. Une fois cette étape franchie, nous pourrons étudier l'implication de différents gènes (jusqu'à 5) sur le développement des AICs. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 24 souris par mutation étudiée, soit 120 souris pour 5 mutations.

Pour la réalisation de ce projet, 176 souris au maximum seront donc utilisées.

Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés et dans la mesure du possible, les animaux contrôles serviront à l'étude de plusieurs gènes. Le modèle sera mis en place par des personnes ayant déjà plusieurs années d'expérience en chirurgie ce qui permettra la réduction du nombre d'animaux pour la mise au point et la validation. Les souris seront suivies quotidiennement les 15 jours suivant la chirurgie puis tous les 2 jours, selon une grille de score permettant d'évaluer le degré de douleur et d'y remédier avec un traitement analgésique approprié.

Dans ce projet, le recours au modèle animal nous permettra donc de cibler rapidement et efficacement les gènes pouvant être impliqués dans la formation des anévrysmes intracrâniens dans le but de limiter toute étude sur un gène candidat qui ne serait finalement pas causale dans l'AIC. Malheureusement, il n'existe pas d'approche expérimentale alternative apportant le degré et la qualité d'informations scientifiques nécessaire pour répondre à cette question.

14273 Les plaquettes, sont des cellules sanguines dépourvues de noyau produites par fragmentation des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elles ont un rôle essentiel dans la prévention et l'arrêt de saignements après une lésion en formant un amas ou « caillot » plaquettaire.

Un excès d'activité procoagulante est à l'inverse associé à un risque accru de formation de caillots dans un vaisseau sanguin. L'identification des acteurs impliqués dans cette activité procoagulante constitue donc des objectifs importants.

Les plaquettes sont reconnues comme étant physiologiquement et fonctionnellement hétérogènes. Lors de l'activation plaquettaire, la formation d'une sous-population distincte de plaquettes procoagulantes en est un exemple. L'âge plaquettaire a été proposé comme déterminant de la fonction plaquettaire et il a été rapporté que la sous-population procoagulante formée par les jeunes plaquettes réticulées, serait significativement plus importante que celle formée par les plaquettes plus âgées.

L'objectif de ce projet est de mieux caractériser la proportion de plaquettes procoagulantes au sein des sous-population de plaquettes jeunes ou plus âgées, et d'évaluer la fonction procoagulante des plaquettes au cours de leur vieillissement. Cette étude permettra de mieux définir la prise en charge des patients traités avec des médicaments anti-plaquettaires.

Réduire : Tous les tests pour mettre au point les immunomarquages ainsi que l'acquisition au cytomètre seront réalisés sur un même prélèvement. Les conditions expérimentales déterminées ainsi seront utilisées pour toutes les autres expériences. De plus, les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Remplacer : L'évaluation de la fonction procoagulante des plaquettes au cours de leur vieillissement ne peut être réalisée *in vitro*, car les plaquettes s'activent spontanément dans ces conditions, ce qui conduit à des changements morphologiques et fonctionnels des plaquettes. Elle peut donc se faire uniquement au moyen de modèles *in vivo*.

Raffiner : Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en cellulose et des lanières de papier afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux.

- Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée des procédures expérimentales afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés.

- Prise en charge péri-opératoire à l'aide d'une fiche de suivi pour évaluer l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation. Des critères d'interruption en fonction de l'aspect clinique des animaux (grille des score) seront mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

Ce projet nécessitera 108 souris.

14274 Malgré les progrès remarquables réalisés au cours de la dernière décennie dans la compréhension, la prévention et le traitement du cancer, les métastases demeurent la principale raison pour laquelle les patients atteints de cancer succombent à leur maladie. Il est devenu clair que de nombreux aspects de ce processus, y compris les mécanismes initiateurs de la dissémination métastatique, sont encore inconnus. Les traitements anticancéreux actuels ciblent principalement les cellules malignes, mais de multiples études précliniques ont montré que la chimiothérapie peut favoriser les métastases. Il y a donc un besoin non satisfait de nouvelles stratégies de lutte contre le cancer avec des mécanismes fondamentalement distincts fondés sur une solide compréhension du processus de la maladie métastatique.

Avec 60 000 nouveaux cas en France tous les ans, le cancer de la prostate représente aujourd'hui la première cause de mortalité chez l'homme après 70 ans. On compte actuellement 9 000 décès par an pour ce cancer qui touche 1 homme sur 8. Actuellement, le Docetaxel est le traitement de référence des cancers de la prostate métastatiques résistants au traitement hormonal (CRPC). Cette chimiothérapie apporte un réel bénéfice au niveau de la survie des malades. Malheureusement, on sait qu'une grande partie des malades traités par ce médicament développent une résistance à la chimiothérapie. C'est pourquoi aujourd'hui, l'enjeu majeur consiste à trouver à la fois des méthodes pour prédire cette résistance et de nouvelles combinaisons de traitements pour surmonter cette résistance et éviter les traitements inutiles et toxiques.

Ces questions complexes ne peuvent pas s'étudier exclusivement *in vitro* et nécessitent l'utilisation de modèles animaux.

Le projet représente un ensemble d'études types qui pourront viser à comprendre des mécanismes impliqués dans la progression tumorale ou à évaluer l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements.

Le projet pourra comporter jusqu'à 16 études. Une étude comportera jusqu'à 60 souris ce qui portera le nombre d'animaux à 960 souris maximum sur 3 ans. Les dommages attendus sont liés au développement d'une tumeur de cancer de la prostate et éventuellement à l'apparition de foyers tumoraux secondaires (métastases). Un suivi rigoureux des animaux, une excellente connaissance des modèles et la définition de points limites adaptés permettront de prendre en charge les

éventuels stress et douleurs occasionnés. Les animaux seront sous anesthésie générale durant les actes d'induction des tumeurs ainsi que pendant les examens d'imagerie.

Ce projet qui mettra en oeuvre des approches par imagerie *in vivo* sera réalisé en respectant la règle des 3R :

Raffinement : les animaux seront étudiés par imagerie *in vivo* non invasive, ce qui n'induit pas de douleur et permet de réduire le stress infligé au cours de l'expérimentation.

Réduction : la mise en oeuvre de l'imagerie permet de réaliser un suivi longitudinal des animaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de données.

Remplacement : les informations attendues ne peuvent pas être obtenues *in vitro* car à ce jour l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant d'étudier le développement tumoral et l'efficacité thérapeutique en tenant compte de la complexité de la physiologie d'un organisme vivant.

14275 Les déficits dans le traitement et le comportement sensoriel sont associés aux maladies neurologiques et neuropsychiatriques humaines incluant l'autisme, la schizophrénie, les crises d'angoisse et dépressions. Une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux du développement et plasticité des systèmes sensorielles et cognitives post-naissance pourrait donc conduire à une nouvelle approche thérapeutique, plus performante pour l'homme. Pour cela, nous étudions la régulation des mécanismes de plasticité cognitive dans le cerveau. Nous utilisons le système visuel des souris comme modèle, car les souris sont génétiquement très connues et assez proche de l'homme. Nous allons induire un stress oxydatif aux neurones et ensuite changer le niveau d'expression de certaines protéines dans le cerveau de souris par injection précis de molécules. Nous utiliserons de l'imagerie optique pour évaluer les effets sur la plasticité cérébrale. Ces interventions nécessitent des procédures de classes modérées, mais nous permettrons de mieux comprendre comment on pourra corriger des problèmes cognitifs liées au stress subis pendant l'enfance.

Ces sont des mécanismes beaucoup trop complexes qui ne peuvent être étudiés par de simples systèmes de cultures. Pour répondre à ces questions, il faut un cerveau complet d'un organisme modèle tel que la souris. Les conditions expérimentales nécessitent au minimum 10 souris par condition pour avoir des résultats statistiquement valables. Les procédures ont été optimisées (e.g. utilisation des mâles et femelles) afin de minimiser le nombre d'animaux, qui sera au maximum 512.

Pour toutes nos expériences, les souris sont anesthésiées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Toute souris ayant subi une expérience sous anesthésie est ensuite placée dans des conditions enrichies pour son bien-être. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les points limites sont décrits pour chaque procédure. Les souris sont hébergées dans une animalerie nouvellement rénovée. Elles sont sous contrôle de la température et de la lumière (en cycle jour/nuit). Elles bénéficient de l'équipement complet pour leur bien-être (cotons pour leur nid, nourriture et eau libre d'accès, nourriture plus riche si besoin). Les visites pour veiller à leur bien-être sont journalières. Les animaux seront utilisés uniquement pour ce projet.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre la régulation des mécanismes de plasticité cognitive dans le cerveau suite au stress subis pendant l'enfance.

14276 Les dysfonctionnements des interneurons cholinergiques du striatum sont impliqués dans un large éventail de troubles neurologiques et neuropsychiatriques (autisme, dystonie, syndrome Gilles de la Tourette, dépendance, maladie de Parkinson.) qui représente un fardeau social et économique élevé pour la population mondiale. Ces interneurons font partie d'un réseau, les ganglions de la base. Ce sont des structures sous-corticales interconnectées impliquées dans les apprentissages sensorimoteurs qui se traduisent au niveau cellulaire par un changement du poids des connexions entre les neurones (synapses). Ces connexions représentent un système dynamique et peuvent être renforcées ou au contraire diminuées selon le contexte. On parle de plasticité synaptique,

indispensable à l'acquisition de nouvelles compétences. Dans la maladie de Parkinson, la plasticité des synapses entre le cortex et le striatum est fortement perturbée et pourrait être à l'origine de certains symptômes moteurs. Nous cherchons à comprendre la relation qui existe entre la plasticité corticostriée et l'acétylcholine, produite par les interneurons cholinergiques et qui est présente en grande quantité dans le striatum. Son équilibre est affecté dans la maladie de Parkinson. Pour atteindre cet objectif, nous utilisons des outils génétiques permettant de manipuler l'activité électrique des interneurons cholinergiques et d'identifier les cibles cellulaires qu'ils modulent en condition normale et parkinsonienne. La nature de notre étude (étude d'un réseau de neurones interconnectés dont la complexité ne peut pas être reproduite) ne permet pas d'envisager le remplacement et nécessite l'utilisation de l'animal et d'expériences *in vivo*. La nécessité du modèle murins se justifie pour plusieurs raisons:

1- Les outils génétiques que nous utilisons ne sont développés que chez la souris ; 2- il existe chez la souris un modèle de la maladie de Parkinson qui est utilisé depuis de nombreuses années et les données accumulées dans ce modèle seront nécessaires à l'interprétation de nos données. Ce modèle est pertinent car il reproduit une partie des symptômes de la pathologie chez l'homme et est donc utile au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Par ailleurs, les approches électrophysiologiques *ex vivo* et *in vivo* se justifient du fait de la complexité de notre système d'étude (un réseau neuronal dynamique, hétérogène et interconnecté) qui ne peut pas être reproduit *in vitro*. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements enrichis pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et environnemental des animaux est contrôlé. Pour limiter le nombre d'animaux produit, nous utilisons d'une part à la fois des animaux mâles et femelles et d'autre part nous recourons à des tests statistiques nous permettant de déterminer avec précision le nombre nécessaire d'animaux pour vérifier nos hypothèses expérimentales. D'autre part chercheurs et étudiants s'organisent pour analyser les données produites dans les meilleurs délais afin de stopper les expériences dès que l'objectif est atteint. Ainsi, ce projet d'une durée de cinq ans nécessitera l'utilisation de 1 700 souris (1 500 souris pour les mesures électrophysiologiques dont 600 souris modèle de la maladie de Parkinson, 70 souris pour les expériences de marquage cellulaire et 130 pour l'approche comportementale). L'induction de la maladie de Parkinson chez la souris induit une procédure chirurgicale au cours de laquelle tout est fait pour réduire la douleur (anesthésie profonde et contrôlée lors de la chirurgie, suivi quotidien post-chirurgical des animaux et utilisation d'antidouleur si nécessaire).

Les objectifs proposés sont parfaitement réalisables sur 5 ans aux vues des différentes ressources disponibles (2 chercheurs statutaires, 1 ingénieur et 2 étudiants en Thèse). Les personnes affectées au projet sont toutes formées et qualifiées à l'expérimentation animale. L'animalerie du laboratoire est agréée, et maintenue en statut sanitaire contrôlé (exempt d'organismes pathogènes spécifiques) ce qui concourt au bien-être des souris.

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer et touche 4,6 millions de personnes dans le monde. Même si peu de données sur les coûts de la maladie de Parkinson sont disponibles, il est clair que cette pathologie représente un grave problème de santé, ce qui entraîne une augmentation des dépenses de santé et une perte de productivité. Une meilleure compréhension des événements cellulaires qui sous-tendent cette pathologie est cruciale non seulement pour accroître nos connaissances sur les aspects fondamentaux, mais aussi pour découvrir de nouvelles cibles ayant un potentiel thérapeutique.

14277 Dans les milieux terrestres, les contraintes hydriques devraient favoriser l'évolution de tactiques de conservation de l'eau et d'optimisation de son utilisation. Ces adaptations impliquent principalement des mécanismes de réduction des pertes hydriques cutanées et/ou respiratoires mais aussi des modifications du métabolisme. Les capacités d'acclimatation des pertes hydriques cutanées en réponse à une restriction en eau ont déjà été mise en évidence chez certaines espèces de reptiles.

Cependant, aucune étude n'a jusqu'à présent caractérisé les différents mécanismes de pertes hydriques le long de gradients géographiques de disponibilité en eau et de conditions thermiques.

Nous échantillonnerons plusieurs populations du lézard *Zootoca vivipara* le long d'un gradient d'altitude allant des Pyrénées à l'Aquitaine. Des populations reliques de plaine, fortement soumises aux conséquences du réchauffement climatique, seront incluses et comparées à des populations du cœur de la distribution de l'espèce dans le massif montagneux des Pyrénées. La morphologie, l'état hydrique plasmatique (osmolalité), les pertes hydriques totales et cutanées, le métabolisme au repos et les préférences thermiques seront caractérisées dans un contexte comparatif.

Nous échantillonnerons 12 populations le long d'un gradient d'aridité de l'habitat en capturant un nombre limité mais homogène de lézards mâles dans chaque population (15 lézards adultes maximum). L'effectif maximal d'individus sera donc 180. Les animaux seront transportés et maintenus en captivité dans des conditions optimales et enrichies de dispositifs d'abris et de thermorégulation. Nos protocoles de mesure seront faiblement invasifs et les animaux seront tous relâchés sur le terrain après une période de captivité maximale d'un mois. Aucun marquage individuel ne sera pratiqué, les animaux seront identifiés par des photographies et isolés individuellement pendant le séjour en captivité.

Le lézard vivipare est particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de sa forte dépendance aux zones humides en conditions naturelles. Notre hypothèse générale est que les populations soumises aux plus fortes conditions d'aridité climatique soient caractérisées par des adaptations éco-physiologiques via la réduction des pertes hydriques cutanées, une dépression métabolique et/ou un abaissement des températures corporelles préférées.

La règle des 3 R a été prise en compte de la manière suivante:

- Remplacement: les questions étudiées concernent spécifiquement le lézard vivipare qui est une espèce adaptée au froid. Un remplacement n'est donc pas envisageable :
- Réduction: nous avons réduit au minimum les effectifs par populations (15 individus) pour pouvoir détecter des effets interprétables statistiquement.
- Raffinement: les conditions de captivité seront optimisées avec un enrichissement du milieu (différents abris, substrat) répondant aux besoins de l'espèce.

14278 En élevage porcin, une injection de fer est très souvent réalisée sur les porcelets nouveaux nés afin de pallier la carence en fer du lait de leur mère. Sans cette injection, le porcelet peut présenter dans ses premières semaines de vie, une forte anémie, pouvant conduire à un ralentissement de la croissance et à une susceptibilité accrue aux maladies, voire à la mort. Il s'agit d'une dose massive susceptible de perturber les systèmes biologiques de contrôle de l'utilisation du fer. Nous souhaitons donc tester différentes modalités d'apport (notamment par voie orale) qui permettent un apport progressif et mesurer leurs effets sur les performances zootechniques des porcelets et les indicateurs de l'anémie en particulier la teneur en hémoglobine, le nombre et le volume des globules rouges dans le sang et de l'état de santé. Le groupe témoin recevra l'injection intra-musculaire de fer comme cela est habituellement pratiqué.

L'étude sera conduite en 3 essais identiques de 12 portées chacun au maximum, ce qui impliquera au total 360 porcelets (à raison d'une dizaine de porcelets allaités par portée). Au sein de chacune des 36 portées, nous sélectionnerons 6 porcelets, 2 petits, 2 moyens et 2 gros, un mâle et une femelle pour chaque paire, sur lesquels seront effectuées les prises de sang: le nombre total maximal de porcelets dont le sang sera prélevé s'élèvera à 36 x 6 porcelets soit 216 porcelets.

Le sang de chaque porcelet sélectionné sera prélevé à 5 reprises, à 2-3 jours d'âge (valeur basale), en milieu de lactation (vers 21 jours d'âge), une semaine avant et 2 jours après le sevrage (qui a lieu à 49 jours d'âge), puis 15 jours après le sevrage. Deux modalités alternatives au fer injectable seront testées. La présence de fer dans le sol permet d'éviter l'anémie aux porcelets élevés en plein air, nous mettrons donc de la terre à disposition des porcelets (1ère alternative testée) et/ou de la tourbe (par exemple terre de Brière, 2ème alternative testée).

La règle des 3 Rs a été prise en compte :

-remplacer : le projet concernant spécifiquement le porcelet en croissance, son utilisation ne peut être remplacée

-réduire : Les traitements seront appliqués à l'ensemble des porcelets des portées car les stratégies de supplémentation en fer testées reposent sur la prise volontaire d'un substrat distribué directement dans la loge de la truie et de sa portée : il n'est donc pas possible d'attribuer différents traitements au sein d'une même portée. Le nombre total de 12 portées par traitement, réparties en 3 essais identiques, a été choisi de façon à pouvoir tester l'effet des traitements de façon solide, en évitant toute confusion statistique entre les effets des traitements, de la portée et de la période d'essai. Cependant, nous avons réduit le nombre de porcelets soumis aux prises de sang à seulement 6 animaux par portée : cet effectif permettra de réaliser des tests statistiques pour identifier des différences biologiques entre les 3 traitements en tenant compte de la variabilité intra-portée et des interactions éventuelles avec le sexe et le poids des porcelets.

-raffiner : Le choix de la réaliser dans une installation expérimentale suivant les normes de l'agriculture biologique répond aux objectifs du projet européen financeur qui est appliqué à l'élevage biologique, mais permet aussi d'apporter aux animaux des conditions de vie supérieures en termes de bien-être animal (logement sur paille, âge au sevrage plus tardif, accès à des courettes extérieures...) que s'ils avaient été élevés en animalerie conventionnelle. De plus, parmi les différentes options alternatives à l'injection de fer, nous avons choisi de tester deux stratégies basées sur la prise volontaire d'un substrat qui constitueront un enrichissement du milieu en même temps qu'elles rempliront leur rôle de pourvoyeuses de fer. En effet, le porc est un animal qui aime fouir dans la terre. Aucun lot « témoin négatif », correspondant à des animaux ne recevant aucune supplémentation, ne sera ajouté à cette étude car il conduirait à la production d'animaux anémiés.

14279 La maladie de Stargardt (STGD1) est une dégénérescence rétinienne avec une prévalence de 1 pour 8000/10000 personnes. La rétine, couche la plus interne de l'œil, est responsable de la transmission par le nerf optique de l'information lumineuse vers le cortex visuel. Dans STGD1, la macula, région rétinienne riche en cônes, est principalement affectée. Les cônes sont nécessaires pour la vision diurne et c'est la perte de ce type cellulaire qui entraîne la cécité.

Les photopigments, générés par la vitamine-A et la protéine opsine, rendent les photorécepteurs sensibles à la lumière. Au niveau des segments externes des photorécepteurs, les photopigments sont chimiquement transformés par l'énergie lumineuse. Cela génère des signaux qui sont à leur tour transformés en information électrique transmise au cortex visuel. Ce processus, appelé phototransduction, crée également des sous-produits toxiques dérivés de la vitamine-A, pouvant s'accumuler dans les photorécepteurs. Une protéine, ABCR4, codée par le gène ABCA4, est nécessaire pour le transport des produits toxiques afin qu'ils puissent être métabolisés dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), couche cellulaire indispensable à la fonction et à la survie des photorécepteurs. Les mutations liées à STGD1 se trouvent majoritairement dans le gène ABCA4 et provoquent une accumulation de produits toxiques et la mort des photorécepteurs et de l'EPR. Actuellement il n'existe pas de traitement.

Notre équipe a récemment développé deux modèles de rat transgénique pour STGD1 : un modèle n'exprimant pas le gène ABCA4 (*Abca4*^{-/-}) et un modèle qui exprime le gène ABCA4 portant la mutation la plus courante associée à STGD1, G1961E (*Abca4*^{E/E}). La caractérisation de ces modèles nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'ordre de 500% du niveau des rétinoides toxiques dans les yeux, rendant les animaux plus sensibles aux dommages causés par la lumière.

En parallèle nous avons développé *in vitro* deux stratégies de thérapie génique ciblant le gène *Abca4*. La thérapie génique est un concept novateur de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans les cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Les vecteurs viraux, en particulier les vecteurs recombinant dérivés des virus adéno-associés (AAV), permettent de véhiculer et de protéger ces acides nucléiques. La première nos deux stratégies thérapeutiques, consiste à délivrer deux AAVs porteurs de la première (partie 5') et de la seconde moitié (partie 3') du gène ABCA4 car ce gène est trop grand pour tenir entier dans un virus AAV. La deuxième approche thérapeutique implique le remplacement de la région mutée

du gène par des constructions réparatrices en utilisant la technologie d'édition de gène à l'aide du système CRISPR Cas9.

Les virus AAV seront livrés à la rétine via une injection sous-rétinienne. L'effet thérapeutique sera évalué par réalisation de fonds d'œil associés, d'examen de tomographie à cohérence optique (mesurant l'épaisseur de la rétine) et par électrorétinographie (ERG), test qui évalue indirectement la fonction de la rétine en mesurant la différence de potentiel à travers la surface de la cornée. Ces tests seront effectués 3 mois après injection puis les animaux seront sacrifiés pour mesurer directement la quantité de bis-rétinoïdes toxiques dans les yeux par spectrométrie de masse.

Groupes expérimentaux :

1) 28 rats *Abca4*^{-/-} injectés pour évaluer la première approche thérapeutique ABCA4 dual vector :

- lot 1 : 12 rats recevront à la fois les vecteurs 5' et 3'

- lot 2 : 8 rats recevront uniquement la partie 5'

- lot 3 : 8 rats recevront uniquement la partie 3'

2) 80 rats injectés pour évaluer la seconde approche thérapeutique d'édition de gène à l'aide du système CRISPR « ABCA4 édition » : 32 rats *Abca4*^{+/+} (WT), 24 rats *Abca4*^{-/-} (KO) et 24 rats *Abca4E/E* (KI) :

- lot 1 à 4 : 8 rats WT, un groupe avec le contrôle pour édition (Cas9 qui ne cible rien), un groupe pour tester la spécificité d'édition (Cas9 programmé pour cibler *Abca4*), un avec le contrôle pour réparation (Cas9 qui ne cible rien et l'ADN réparateur du gène *Abca4* du rat), un pour édition spécifique chez le rat (avec Cas9 programmé pour cibler *Abca4* et l'ADN réparateur du gène *Abca4* du rat). Ces animaux nous permettront d'optimiser le système d'édition chez un animal sain.

- lot 5 à 7 : 8 rats KO, un groupe avec le contrôle pour édition, un pour édition spécifique chez le rat et un pour édition spécifique chez l'homme (avec Cas9 programmé pour cibler *Abca4* et l'ADN réparateur du gène *Abca4* humain).

- lot 8 à 10 : 8 rats KI, un groupe avec le contrôle pour édition, un pour édition spécifique chez le rat et un pour édition spécifique chez l'homme.

Application de la règle des 3R :

1) Réduction :

La détermination du nombre d'animaux a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience d'études similaires en thérapie génique des maladies de la vision. L'ERG étant le test qui présente le plus de variance, nous avons déterminé notre taille d'échantillon par rapport à lui. Une analyse de puissance a été effectuée avec le logiciel R et le package *pwr* en utilisant l'écart-type que nous observons dans les mesures d'ERG chez nos rats WT. A partir de cette analyse nous avons sélectionné une taille d'échantillon $n=8$ animaux/lot comme minimum.

2) Raffinement :

Le souci du bien-être animal passera par : de bonnes conditions d'hébergement, un suivi régulier des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces (mise à disposition du personnel animalier d'une grille de scoring de la douleur, cf. annexe du document de saisine) et par la mise en place de mesures adaptées (anesthésie, analgésie ou euthanasie par des méthodes reconnues).

3) Remplacement :

La rétine, structure complexe composée de multiples couches de neurones et cellules nourricières, ne peut être reconstituée parfaitement *in vitro*. L'utilisation de modèles animaux est donc indispensable pour étudier la pathophysiologie et le transfert de gènes dans la rétine.

14280 Ce projet a pour but d'augmenter l'activité thérapeutique contre le cancer du sein par combinaison de deux types de formulations ciblées. Combinaison de deux types d'agents anticancéreux (un leurre moléculaire et une drogue anticancéreuse) afin d'augmenter l'activité des lymphocytes T qui représentent les acteurs majeurs de l'immunité antitumorale.

Dans cette stratégie, nous utiliserons deux formulations : 1) des liposomes délivrant aux cellules cancéreuses un oligonucléotide leurre ADN ciblant la voie de signalisation PDL1 de la cellule

tumorale impliquée dans l'inactivation des lymphocytes T infiltrés dans la tumeur 2) des micelles délivrant une drogue anticancéreuse aux cellules immunitaires inhibitrices du microenvironnement tumoral pour augmenter l'activité des lymphocytes T infiltrés.

Nous avons déjà mis au point la formulation du leurre moléculaire dans les liposomes et la formulation de la drogue anticancéreuse dans les micelles.

Les liposomes délivreront des inhibiteurs de la prolifération des cellules cancéreuses et des métastases. Pour renforcer l'efficacité des liposomes, nous leur couplerons deux ligands, soit la biotine soit le cholesteryl oleate.

Des liposomes sans ligand seront aussi utilisés.

Les micelles délivreront la doxorubicine, drogue anticancéreuse. Pour cibler les tumeurs nous grefferons le peptide M2pep de ciblage des tumeurs aux micelles. Des micelles sans ligand et avec ligand non-spécifique seront aussi utilisés.

Les souris seront d'abord injectées avec des cellules cancéreuses dans une mamelle de la région pelvienne pour un modèle de cancer du sein orthotopique. 7 jours après implantation tumorale elles seront traitées avec les formulations par voie intraveineuse ou sous-cutanée.

Nous suivrons la croissance tumorale par échographie entre les groupes.

Les animaux seront anesthésiés durant la procédure. Les animaux seront surveillés quotidiennement dès leur arrivée au laboratoire avec une grille de scoring avec des points limites adaptés.

Les avantages liés à ce projet sont l'évaluation de nouveaux traitements contre le cancer du sein.

Nos travaux seront menés dans le respect de la règle des 3R : l'effectif des souris mis en œuvre est limité au strict minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement.

Nous avons déjà effectué des travaux in cellulo préalables sur des cellules cancéreuses murines. Les travaux chez le modèle animal sont dans la continuité de ces résultats.

L'implantation tumorale peut entraîner une douleur. C'est pourquoi nous suivrons les animaux avec une grille de scoring présentant des points limites prédictifs liés aux signes de douleur et à la croissance tumorale.

Nous aurons 6 formulations * 5 souris par groupe * 2 modes d'injection = 60 souris + 5 souris non traitées = 65 souris

Ces expériences seront répétées une fois amenant à un nombre de 130 animaux.

14281 Malgré l'amélioration constante de sa prise en charge médicale, le cancer demeure la principale cause de mortalité au monde. Il est donc crucial de développer de nouveaux protocoles thérapeutiques efficaces pour lutter contre ce fléau. Nous savons aujourd'hui que le système immunitaire joue un rôle important dans l'élimination des cellules cancéreuses. Cette découverte a conduit ces dernières années à l'essor des immunothérapies, et en particulier de la vaccination anti-tumorale, qui permet de stimuler spécifiquement le système immunitaire contre les cellules cancéreuses.

De nombreux vaccins thérapeutiques ont été développés mais n'ont montré à ce jour leur efficacité que chez un nombre restreint de patients. Ceci s'explique en partie par le fait qu'au cours du développement du cancer, des mécanismes permettant aux cellules tumorales d'échapper aux attaques du système immunitaire se mettent en place. L'un de ces mécanismes est l'expression progressive de molécules dites « inhibitrices » par les lymphocytes T, principales cellules immunitaires impliquées dans l'élimination des cellules cancéreuses. Ces molécules « inhibitrices » empêchent le lymphocyte T d'agir de façon efficace. Un autre de ces mécanismes est le développement de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) dans la tumeur, permettant d'apporter de l'oxygène et des nutriments aux cellules cancéreuses. Cette angiogenèse empêche l'arrivée des lymphocytes T au sein de la tumeur et favorise un environnement hostile au système immunitaire (environnement immunosuppresseur). Des thérapies ont été développées pour contrer

ces deux mécanismes et sont actuellement utilisées pour le traitement de certains types de cancers chez l'homme.

L'objectif de notre projet de recherche est d'associer la vaccination thérapeutique à ces deux thérapies afin d'obtenir un traitement plus efficace.

Le développement du cancer étant un processus long et complexe impliquant de multiples composants de notre organisme, cette complexité ne peut pas être mimée *in vitro*. Le modèle animal et les études *in vivo* sont donc nécessaires pour analyser l'interaction entre le système immunitaire et la tumeur.

Pour ce projet, nous étudierons deux types de cellules tumorales : des cellules de cancer colorectal et des cellules de cancer du rein. Afin d'étudier l'influence du microenvironnement tissulaire sur le développement tumoral, les cellules tumorales seront greffées soit sous la peau des souris, soit au niveau d'un organe pour mimer leur développement normal.

Afin de définir la meilleure association entre les différents traitements étudiés, ce projet comprendra tout d'abord l'étude de l'environnement immunosuppresseur et de l'angiogenèse chez des souris porteuses de tumeurs vaccinées ou non.

Suite à cela, nous testerons l'association du vaccin thérapeutique avec les deux autres thérapies étudiées.

Cette étude nécessitera un total de 1380 souris sur 5 ans.

Les procédures expérimentales de ce projet ont été élaborées dans le respect des 3R. Nos études antérieures nous ont permis de définir certains paramètres expérimentaux (fond génétique, schéma vaccinal, modèle tumoral.), et ainsi de réduire le nombre de souris nécessaires pour avoir des résultats statistiquement valides. Chaque procédure expérimentale sera optimisée afin de récupérer le maximum d'échantillons sur le même animal pour réaliser toutes les analyses et limiter le nombre d'animaux utilisés. Nous nous efforcerons de réduire au maximum la souffrance de l'animal en utilisant des antalgiques ou en anesthésiant les animaux lorsque cela est nécessaire. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et suivis régulièrement. Pour chaque procédure, des points limites et des critères d'arrêt sont définis, ce qui permettra de limiter au maximum la souffrance animale et entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

A terme, ce projet devrait apporter une meilleure connaissance des synergies possibles entre vaccination anti-tumorale et thérapies ciblant deux mécanismes d'immunosuppression qui existent au sein de l'environnement tumoral : les molécules inhibitrices et l'angiogenèse. Ceci pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer en proposant de nouvelles stratégies thérapeutiques.

14282 Les patients souffrant de syndrome métabolique (SM) sont confrontés à un risque plus accru de développer des maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2. Ce risque est d'autant plus élevé que la majorité de ces patients développent une résistance à l'insuline, une hormone hypoglycémisante dont l'action permet l'absorption et le stockage du glucose dans les organes tels que le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Outre le développement du diabète de type 2, la résistance à l'insuline est, à long terme, responsable de plusieurs complications métaboliques telles qu'une dyslipidémie, une athérosclérose ou une hypertension artérielle. La résistance à l'insuline étant un état pathologique silencieux, il devient nécessaire de développer de nouveaux outils de diagnostic de l'apparition de la résistance à l'insuline chez les patients SM.

Dans ce contexte, nous nous intéressons aux vésicules extracellulaires (VEs), comprenant les microvésicules (MVs) et les exosomes (EXOs), libérées par les cellules de l'organisme. Ces VEs sont considérées comme de nouveaux biomarqueurs de différentes pathologies et peuvent être impliqués dans la communication intercellulaire. Des travaux préalablement réalisés *in vitro* au sein de notre laboratoire ont démontré que les VEs circulantes de patients SM, à savoir les MVs et les EXOs, induisent une résistance à l'insuline dans les hépatocytes et les adipocytes par des mécanismes bien distincts, ainsi qu'une augmentation des lipides intracellulaires des adipocytes.

Ces effets ne sont, en outre, pas observés avec les VEs circulants de patients non syndrome métaboliques (nSM) ou dans des conditions contrôles sans vésicules.

La question que nous nous sommes posées ici est de vérifier si les VEs de patients SM induise également la résistance à l'insuline *in vivo* dans un organisme aussi complexe que complet. L'objectif de ce projet est d'évaluer, de manière distincte et en comparaison à des conditions contrôle, l'implication des MVs et des EXOs, de patients nSM ou atteint de SM, dans le développement *in vivo* de l'insulino-résistance chez la souris. Et, également, d'évaluer les mécanismes mis en jeu dans l'insulino-résistance induite par ces vésicules.

Pour ce projet, nous estimons qu'un totale de 240 souris wild type (WT) Swiss seront utilisé. Les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés :

- L'injection des MVs et des EXOs directement dans la circulation des souris relève de la stricte nécessité et ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.
- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet.
- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.
- Durant les différentes procédures expérimentales, le recours aux anesthésiants et analgésiques, au renforcement positif (via l'entraînement à la coopération) ainsi que l'utilisation de tapis et lampe chauffants sera primordiale pour réduire et soulager l'inconfort, la douleur et la détresse des animaux.

Les résultats attendus permettront de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les vésicules extracellulaires participent aux altérations métaboliques associées à la résistance à l'insuline dans le syndrome métabolique. A long terme, ces résultats permettraient d'aborder de nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires associées au syndrome métabolique.

Les protocoles décrits ci-dessous pour ce projet d'étude n'ont pas encore commencés, ils ne le seront qu'après un avis favorable de la présente saisine.

14283 Notre système immunitaire nous protège des infections en préservant l'intégrité de notre organisme, ce qui suppose de contrôler l'ampleur des réponses anti-infectieuses et de tolérer les éléments non pathogènes. L'orientation des réponses immunitaires vers la tolérance ou à l'inverse vers l'immunité est contrôlée entre autres par les Cellules Dendritiques (DC). Une mauvaise orientation de ces réponses peut aboutir à des pathologies dues à l'activation inadéquate et/ou excessive du système immunitaire (réactions d'hypersensibilité, auto-immunité) ou à des réponses immunes insuffisantes (infections virales persistantes, cancers). La biologie des DC repose sur leur capacité à capturer les antigènes dans les tissus et à détecter leur caractère inoffensif ou dangereux avant de rejoindre les organes lymphoïdes où elles pourront activer, si nécessaire, une réaction de défense. Les mécanismes moléculaires qui assurent la coordination de ces différentes étapes *in vivo* restent encore peu connus. Les comprendre pourrait permettre de moduler la fonctionnalité des DC et de proposer des traitements ciblés innovants dans les immunopathologies.

Nous avons identifié une protéine intracellulaire exprimée par les DC et qui régule leur capacité de capture antigénique, de migration et d'activation. L'objectif de nos travaux actuels est d'identifier les mécanismes impliqués dans cette voie de régulation des DC et d'en déterminer l'impact *in vivo*, dans deux modèles de pathologie, le cancer et l'allergie de contact. Pour mener à bien nos travaux, nous disposons de deux modèles murins originaux qui surexpriment ou n'expriment pas notre protéine d'intérêt dans les DC. Nous utilisons également des lignées de souris transgéniques permettant de pister ou d'éliminer certaines populations cellulaires comme les lymphocytes T régulateurs.

A l'heure actuelle, aucune approche *in vitro* ne permet de reproduire de façon satisfaisante l'ensemble des phénomènes impliqués dans l'initiation des réponses immunitaires. C'est pourquoi nous avons besoin de travailler avec ces modèles animaux. Le raffinement sera pris en compte, nous veillerons au bien être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'anxiété et la détresse subit par les animaux, par exemple, en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons. Trois fois par semaine, un suivi sera effectué pour chaque souris de chaque procédure, et des fiches de bien être animal seront établies faisant état des point limites à surveiller. Nous allons également réaliser une partie de nos tests *ex vivo* pour remplacer et réduire le nombre de souris utilisées, nous allons congeler des cellules de moelle osseuse pour pouvoir dériver des DC à partir de stocks congelés et nous avons conçus des protocoles expérimentaux optimisés pour réduire le nombre d'expériences et donc de souris contrôles nécessaires tout en garantissant leur validité statistique.

Au total, ce projet nécessitera l'utilisation de 585 souris, nombre d'animaux qui est réduit au minimum, mais suffisant pour pouvoir faire des comparaisons et des statistiques exploitables.

14284 Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur les réactions du système cardiaque dans le cadre d'un stress physiologique. Nous exercerons ce stress par l'enrichissement en graisse du régime fourni à notre modèle murin.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, afin de mettre en évidence l'impact de la suppression du gène, par comparaison avec des animaux contrôles non modifiés.

REMPACEMENT : Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Ce projet est défini avec 4 conditions expérimentales (mutant ou contrôle, régime gras ou normal) comportant chacun 9 animaux, soit un total de 36 souris.

REDUCTION : Ces effectifs correspondent aux nombres définis par les études de puissance réalisées au sein de notre institut pour les procédures expérimentales prévues. Ils ne peuvent être encore plus réduits sans affecter notre capacité à conclure de manière valide.

Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les fonctions cardiaques ainsi que les capacités d'homéostasie lipidique.

Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette série de tests permet de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact de cette délétion sous un régime standard, mais aussi dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse.

Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

RAFFINEMENT : Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire.

Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

Au cours des procédures expérimentales, tous les efforts seront faits pour préserver le bien-être animal (gel ophtalmique durant les anesthésies, réveil sur couverture chauffante)

Les souris utilisées sont issues de lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun phénotype létal ou majeur n'a été observé.

14285 CONTEXTE

Le traitement des métastases hépatiques à proximité des vaisseaux sanguins (zone du confluent cavo-sus-hépatique) fait partie des contre-indications à la chirurgie. D'autres techniques visant la

destruction tumorale comme la radiofréquence et la cryothérapie se montrent inefficaces dans ce contexte en raison d'une dispersion de l'effet thermique par le flux sanguin.

Les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) représentent une technique de destruction tumorale efficace et peu dépendante de la perfusion sanguine. La destruction tissulaire par HIFU apparaît donc très indiquée pour traiter la zone du confluent.

La sonde HIFU qui sera mise en œuvre est actuellement utilisée en clinique pour traiter des métastases dans d'autres zones du foie. La technique n'est pas dépendante du flux sanguin pour les vaisseaux inférieurs à 5 mm de diamètre mais il n'existe pas de données sur les structures vasculaires majeures du foie. Il a été montré précédemment la bonne tolérance à 7 jours du traitement du confluent en ciblant une zone qui évite les lésions secondaires non désirées.

OBJECTIFS

- 1- Assurer la répétabilité de lésions HIFU au niveau de la zone cible sélectionnée précédemment,
- 2- Ajuster la puissance du traitement permettant le traitement du parenchyme hépatique autour et au contact de la veine sans thrombose secondaire.

Cette mise au point effectuée ici sera utilisée par la suite dans une étude de suivi de tolérance par Doppler en vue du passage en clinique du traitement.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 2 ans mettra en œuvre un maximum de 3 porcs. La procédure consistera à opérer l'animal sous anesthésie générale, d'appliquer le traitement par HIFU dans la région cavo-sus-hépatique puis à suivre l'animal pendant 7 à 10 jours. Enfin l'animal sera mis à mort et autopsié pour rechercher des complications et prélever le foie et les organes environnants pour analyse histologique et contrôle de la localisation de la lésion par IRM (ex-vivo).

Conformité avec les 3R :

Réduction : 3 animaux est le strict minimum nécessaire pour évaluer la reproductibilité du traitement.

Raffinement : Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La sonde sera manipulée par des chirurgiens expérimentés. La stratégie d'imagerie a été élaborée avec un radiologue : vérifier le flux sanguin par Doppler et visualiser la lésion par IRM sur pièce de foie, ce qui permet d'éviter le passage à l'IRM de l'animal anesthésié.

Remplacement : cette étude a débuté avec des travaux réalisés ex-vivo et de la modélisation afin de valider la technique ce qui a permis de repousser le passage à l'animal.

14286 En station expérimentale, le sang des porcs est collecté pour des examens sanitaires ou des dosages physiologiques.

Ces prélèvements de sang chez le porc sont habituellement pratiqués à la veine jugulaire qui est interne et non visible.

Cela impose une contention au lasso nasal, aussi appelé « tord nez », placé autour du groin. Celle-ci est préjudiciable à la relation de confiance nécessaire avec l'animalier.

Nous proposons de tester une immobilisation du porc par la distribution d'eau sucrée et de profiter de cette immobilisation pour réaliser les prélèvements de sang ; il s'agit clairement de séances d'entraînements médicaux destinées aux animaux de station expérimentale.

La validation de cette technique serait une réelle amélioration des conditions de prélèvements pour l'animal et l'animalier, le succès de ce projet permettrait la réalisation de vidéo de démonstration pour un développement large de cette technique.

Nous testerons sur 10 jeunes femelles, futures reproductrices, le prélèvement en 3 phases:

- obtention de l'immobilisation de l'animal lors de la distribution d'eau sucrée
- massage par un second animalier de la zone de prélèvement suite au succès de ces 2 premières phases:
- prélèvement de sang lors de l'immobilisation

Le distributeur d'eau sucrée est présenté en hauteur pour entraîner l'extension du cou du porc et ainsi permettre un meilleur accès à la veine jugulaire.

La règle des 3Rs a été prise en compte:

Remplacer n'est pas possible car il s'agit spécifiquement de tester les prélèvements de sang sans contention de l'animal.

Réduire a été pris en compte nous testerons la méthode sur 10 femelles et si les 2 premières phases sont un échec, aucun prélèvement de sang ne sera réalisé.

Raffiner est le cœur même de ce projet, ces distributions permettront de favoriser une bonne relation homme animal (RHA). En outre, les femelles sont hébergées sur d'épaisses litières de paille qui permettent le comportement de fouissage.

14287 En plus de sa réduction en superficie au cours des dernières décennies, l'espace rural a été considérablement transformé dans le même temps notamment à cause des changements de pratiques agricoles et de l'intensification de l'agriculture moderne. Même si les pressions d'origine humaine (ou pressions anthropiques) sont reconnues comme une cause du déclin de nombreuses espèces aviaires, l'impact des changements de pratiques agricoles sur les comportements des espèces habitant les espaces ruraux a été peu abordé en comparaison des effets de l'urbanisation. Bien que le comportement soit le pivot central pour bon nombre d'interactions que ce soit au sein même de l'individu (physiologie), au sein d'une même espèce dans une population (traits d'histoire de vie, interactions intraspécifiques) ou au sein d'une communauté (interactions interspécifiques), la plupart des études se sont intéressées à l'impact des pressions anthropiques sur les traits d'histoire de vie principalement. Comprendre l'impact des pressions anthropiques sur le comportement, la physiologie, la reproduction et la survie des populations d'espèces en déclin revêt une importance capitale dans une optique de conservation. Ce projet vise comprendre le lien entre les perturbations anthropiques et différents traits comportementaux du busard cendré (*Circus pygargus*), une espèce d'intérêt patrimonial, inscrite à l'annexe I de la Directive Oiseaux de l'Union Européenne, afin de déterminer les conséquences en termes de survie et reproduction, d'interactions entre individus et avec les autres espèces. Différents types de pressions anthropiques seront étudiés *in natura*, comme la pression de dérangement, la distance aux infrastructures humaines, la pression pesticide. Ces travaux se dérouleront sur 5 ans car les populations de busards sont largement dépendantes des populations de campagnols à dynamique cyclique sur généralement sur 3 ans (une année de très faible densité de population, une année moyenne et une année de très forte densité populationnelle). De ce fait, il est nécessaire d'effectuer le suivi sur plusieurs années afin de prendre en compte ce facteur important pour la dynamique populationnelle des busards. Au maximum, 120 individus par an seront suivis soit sur 5 ans 600 individus maximum.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacement : S'agissant de suivi populationnel pour comprendre des mécanismes complexes en milieu naturel, il est impossible de remplacer les animaux vivants par des méthodes *in vitro* ou *in silico* car ces données n'existent pas à l'heure actuelle.

- Réduction : chaque année un maximum de 40 nids contenant chacun en moyenne 3 poussins soit 120 individus seront suivis pour un total de 600 individus sur 5 ans au maximum. Les données collectées sur chaque individu (mesures morphométriques, échantillons sanguins) permettront l'analyse de différents paramètres (croissance, développement, stress, immunité, génétique). Des modèles statistiques adaptés (modèles linéaires généralisés à effets mixtes) seront utilisés afin de pouvoir capturer les effets intra- et inter-nichées.

- Raffiner : L'ensemble des manipulations est réalisé dans le respect de l'animal aussi bien des poussins qui sont directement manipulés que des adultes nicheurs présents au nid. Les expérimentations sont faites de façon à minimiser le stress, tout dommage durable et la douleur et ce dans un temps limité et toujours à proximité du nid. Les expérimentations sont réalisées en parallèle du suivi pluriannuel de la population de busard cendré dans un but de protection. Le nombre de visites au nid est également limité dans le même but de minimisation du dérangement.

14288 Pour la France métropolitaine, qui compte environ 241 000 couples d'oiseaux marins nicheurs répartis en 28 espèces, les informations relatives aux niveaux de contamination manquent cruellement. Afin de pallier à ce manque de connaissance ce projet vise à examiner les niveaux et effets des contaminants présents chez des Goélants qui sont d'excellent indicateurs de la pollution. Pour ce faire nous étudierons quatre espèces de goélants avec des écologies contrastées (milieu marin, littoral, terrestre) faisant déjà l'objet d'un suivi populationnel (baguage, dénombrements) depuis plusieurs années. Ce projet s'intègre dans le cadre d'un suivi national des contaminants chez les oiseaux marins qui répond à une directive Européenne.

Dans ce contexte, nous souhaitons : 1) établir l'état des lieux sur les contaminants (éléments traces dont le mercure, les polluants organiques persistants et les composés poly-et perfluorés) présents chez les adultes et poussins de quatre espèces de goélants (argenté, brun, leucophé et marin) ; 2) interpréter les niveaux observés via l'écologie trophique 3) estimer les effets de ces contaminants sur la physiologie et la reproduction. Ce projet sera réalisé sur 20 adultes et 20 poussins (proches de l'envol) de chaque espèce par an. Situés en haut de chaîne alimentaire, les goélants constituent d'excellentes sentinelles pour le suivi des polluants sur le littoral et les résultats obtenus dans ce projet fourniront les toutes premières données sur de l'état de contamination par les polluants environnementaux des oiseaux marins de France métropolitaine.

Ce projet, déployé sur deux années reposera sur des prises de sang (une prise par individu) et sur la collecte de 4 -5 petites plumes de couverture par individu. Le nombre d'individus par groupe sera de 20. L'effectif maximum sera de $320 = 20 \text{ individus} \times 2 \text{ classes d'âge} \times 4 \text{ espèces} \times 2 \text{ ans}$.

La règle des trois R a été prise en compte de la manière suivante :

- Remplacement: les questions étudiées concernent spécifiquement les espèces de Goélants. Les quatre espèces choisies sont situées en haut de chaîne alimentaire et sont indicatrices des contaminants environnementaux avec des écologies contrastées (terrestre, littoral et marin). Un remplacement n'est donc pas envisageable.

- Réduction: Nous avons réduit au minimum les effectifs par groupe (20 individus).

- Raffinement: la prise de sang sera réalisée sur la veine brachiale car cette technique minimise le stress de contention et est très bien maîtrisée. La durée de contention sera réduite au minimum (<15 min).

14289 Le vieillissement est un processus dont on ne connaît que quelques facettes. Certains animaux ne montrent en effet pas de signe évident de vieillissement, en particulier de leur fonction de reproduction. Pour établir des bases d'investigation, nous proposons d'étudier l'évolution du succès reproducteur chez des mâles de triton crêté (*Triturus cristatus*, amphibien). Nous souhaitons faire des tests de choix de partenaires sexuels chez des femelles par rapport à l'âge des mâles. Nous projetons aussi d'établir les capacités métaboliques des mâles en fonction de l'âge.

Nous utiliserons des animaux prélevés dans la nature et maintenus en captivité le moins de temps possible.

Remplacer : l'objectif étant de mieux connaître les processus de vieillissement chez cette espèce d'amphibiens dans un but de protection, il n'est pas possible de remplacer cette espèce par une autre ou par une méthode alternative.

Reduire : Le nombre d'individu est réduit au strict minimum en fonction des statistiques nécessaires pour la comparaison des lots de vieux et de jeunes mâles. L'analyse des préférences sexuelles de 20 femelles devrait permettre de tester nos hypothèses. Chaque femelle ayant le choix entre deux mâles, le nombre total d'individus est de 60 (20 femelles et 40 mâles).

Raffiner : Ils seront maintenus en stabulation dans un local situé à côté des lieux de capture, à la même température que dans la nature. Ils seront nourris avec des vers de terre, nourriture appétissante et nutritive. Les stress seront ainsi réduits au maximum.

Transportés au laboratoire pour mesurer leur consommation d'oxygène, les animaux seront hébergés à la même température que sur le terrain. La durée de séjour au laboratoire est limitée à 24 h, à l'issue desquelles ils seront relâchés dans leur milieu d'origine.

Globalement ce projet ne comporte pas d'atteintes à l'intégrité physique des animaux, si l'on excepte le prélèvement sous anesthésie d'un doigt, l'étude histologique des phalanges permettant d'établir l'âge de l'individu. Le doigt prélevé régénère en moins d'une année.

14290 La maladie de Parkinson est la deuxième des maladies neurodégénératives les plus fréquentes. Malgré cela, les causes sont encore mal connues. Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que l'accumulation de la forme toxique de la protéine alpha-synucléine serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques et des problèmes moteurs conséquents. De plus, la maladie de Parkinson est aussi caractérisée par des symptômes non moteurs qui incluent des troubles du sommeil. Or ce type de symptômes a été, jusqu'à ces dernières années, moins étudié que les symptômes moteurs associés à la maladie.

Le but de notre projet est d'étudier la contribution du sommeil dans l'élimination de protéines pathologiques dans la maladie de Parkinson.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de déterminer que le nombre de souris nécessaires est de 95, incluant les groupes expérimentaux, leurs contrôles et les animaux qui seront utilisés pour l'entraînement à la procédure chirurgicale. Le remplacement est impossible pour ces expériences qui sont centrées sur l'enregistrement du sommeil, ce qui rend l'utilisation de l'animal entier incontournable. Le raffinement fera l'objet d'une attention particulière de la part des expérimentateurs avec pour objectifs de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupe sociaux le plus longtemps possible. Leur isolement, nécessaire à la protection des équipements et des animaux, sera strictement limité au temps des procédures. Nous serons soucieux de palier à l'absence de contact direct par des contacts visuels et olfactifs. Ils auront à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux sera surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie et accrue dès qu'un signal d'appel sera constaté. Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture analgésique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montrera des signes de souffrance. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si besoin. Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement spontané de l'animal sans contention.

14291 Les peptides sont des composés chimiques permettant la transmission d'informations entre deux neurones. Un neurone libère le peptide tandis qu'un second va le capter grâce à un récepteur (R) spécifique, permettant ainsi d'assurer la transmission d'informations dans le cerveau. Notre modèle de recherche est celui d'un peptide exprimé majoritairement dans une population neuronale dont les projections touchent de nombreuses aires cérébrales impliquées dans la prise alimentaire, la réponse au stress, le sommeil et d'autres fonctions sensori-motrices, telles que l'apprentissage et la mémorisation. La distribution de ce peptide est très conservée chez les mammifères, notamment chez les rongeurs et l'homme. Ce peptide peut se lier à deux récepteurs nommés R1 et R2. Ces deux récepteurs ont été retrouvés chez l'Homme alors qu'un seul récepteur, R1, est présent chez la souris.

Le modèle animal souris a permis d'étudier en détail les caractéristiques fonctionnelles du récepteur R1 et de comprendre par extrapolation son importance et ses potentialités en terme de santé humaine. Le récepteur R2 étant absent chez la souris, sa caractérisation est impossible. Il est donc apparu nécessaire de générer un modèle de souris « humanisée » pour le R2. L'obtention de cette lignée génétiquement modifiée exprimant le gène du récepteur R2 humain a été obtenue avec succès avec une équipe internationale partenaire.

Des expériences préliminaires réalisées au sein d'une équipe partenaire ont montré que les souris exprimant le récepteur R2 et soumises au stress de l'hébergement en cage isolée, sont, sous un

régime riche en graisse, résistantes à l'obésité par rapport aux souris contrôles WT littermate. Dans le cadre d'expériences menées au sein de notre laboratoire sur des souris hébergées en groupes sociaux classiques et soumises au même régime obésogène, nous n'avons pas observé de résistance à la mise en place de l'obésité chez les souris exprimant le R2. Le stress engendré par l'isolement semble donc nécessaire pour ce phénotype.

Dans un premier temps, nous choisirons parmi plusieurs conditions d'hébergement compatibles avec l'infrastructure de notre animalerie, celles capables de reproduire le phénotype des souris exprimant le récepteur R2, mis en évidence par nos collaborateurs. L'étude du comportement alimentaire sous régime obésogène sera alors poursuivie sur une lignée invalidée pour le Récepteur 1 (KOR1) et une lignée invalidée pour R1 et exprimant le R2 (KOR1/KIR2), les souris WT littermate servant toujours de contrôle. Dans un deuxième temps afin d'élucider les fonctions et les mécanismes d'action du R2, nous analyserons sur toutes ces lignées de souris, le rôle sur la prise alimentaire, du seul antagoniste à ce récepteur décrit dans la littérature (le composé 38).

Pour réaliser toutes les procédures de ce projet nous utiliserons 1108 animaux.

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

-Remplacement : L'étude de l'obésité nécessite un système intégré affectant simultanément plusieurs tissus (foie, tissus adipeux et cerveau). L'obésité n'est donc pas pour l'instant modélisable *in vitro*. Le développement de l'obésité, et plus généralement la régulation du poids corporel, fait appel à plusieurs organes et processus intégrés, notre étude doit donc nécessairement se faire sur l'animal entier.

-Réduction : Le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables (basé sur les expériences précédemment menées et un calcul statistique pour trouver un effet significatif). Pour évaluer le nombre d'animaux utilisés, nous avons utilisé le programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des données, qu'elle soit normale ou non.

-Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des cages sur portoirs, avec nourriture et boisson ad libitum.

Avant expérimentation, les souris seront acclimatées à leur cage individuelle pendant une à deux semaines durant lesquelles les expérimentateurs les habitueront à être manipulées. Pendant toute la durée du régime, les animaux seront pesés 3 fois par semaine afin de suivre leur poids. Les expérimentateurs évalueront aussi l'état général des souris quotidiennement afin de déterminer la présence ou non de signes de stress ou de souffrance (attitude soumise, dos voûté, respiration difficile, démarche anormale, diarrhée, vocalises,). En cas de stress ou de souffrance, les animaux seront soignés selon la sévérité de la douleur observée et en cas où les signes de souffrance persisteraient, les animaux souffrants seront euthanasiés. Une fiche d'observation et une grille d'évaluation de l'état de nos souris ont été établies.

14292 La leucémie aigüe promyélocytaire (LAP) est un cancer du sang déclenché par une anomalie génétique caractérisée par la présence d'une protéine anormale (PML/RARA), qui est nécessaire et suffisante pour déclencher la maladie.

Les traitements actuellement utilisés sont une combinaison de deux molécules qui entraînent la destruction de la protéine anormale et l'éradication définitive de la maladie.

Notre projet s'articule autour de la caractérisation des événements en amont et en aval de la dégradation de cette protéine, afin d'identifier des mécanismes qui pourraient être activés dans d'autres types de cancer. Pour cela nous allons développer de nouveaux modèles de souris dans lesquels le gène codant la protéine PML sera inactivé ou modifié. Ces mutants du gène Pml ont déjà été caractérisés et validés *in vitro* en culture cellulaire. Malheureusement, ces modèles cellulaires ne récapitulent pas toute la réponse physiopathologique. Des explorations *in vivo* sont donc à ce stade devenues indispensables pour appréhender la réaction d'un organisme entier et

pour éprouver nos hypothèses en situation physiologique, en se rapprochant de celle retrouvée chez le patient.

Pour mener à bien ce projet d'une durée de 5 ans, nous allons produire 9 nouveaux modèles de souris génétiquement altérées, 7 modèles pour le gène *Pml* et 2 modèles pour deux gènes partenaires de *Pml*, tous ayant été validés *in vitro*. Cette création de modèle implique l'utilisation de souris femelles recevant un traitement hormonal (injection intra-péritonéale sur souris non anesthésiée n'entraînant pas de douleur supérieure à la pique d'aiguille) permettant la production d'un grand nombre d'embryons et limitant ainsi le nombre de femelles « donneuses d'embryons ». Deux jours après le traitement, ces souris seront euthanasiées et les embryons (au stade 1 cellule) prélevés puis génétiquement modifiés par des techniques de biologie moléculaire avant d'être réimplantés dans l'appareil reproducteur de souris femelles « mère porteuses ». Cette étape de réimplantation se fait par une technique chirurgicale nécessitant une anesthésie générale des souris « mères porteuses », une analgésie adaptée (injection sous-cutanée pré-opératoire) et un suivi quotidien du bien-être des animaux. Après les 3 semaines de gestation des « mères porteuses », nous attendons la naissance des souriceaux génétiquement altérés. Les souris ainsi générées seront caractérisées par un suivi de leur apparence globale, de leur croissance, de l'aspect du pelage, de leur comportement afin de déterminer si l'altération génétique entraîne un phénotype anormal ou non sur le bien-être de ces animaux. Cette première partie du projet nécessite 522 souris au total, dont :

- 135 souris « donneuses d'embryons », 135 souris « mères porteuses » pour la génération des 9 nouvelles lignées de souris présentant des mutations sur le gène *Pml*.
- 252 souris pour la caractérisation des souris génétiquement altérées qui se fera sur 2 générations (moitié de mâles et moitié de femelles).

Après cette étape de création de modèles de souris porteuses de formes modifiées du gène *Pml* ou de formes modifiées de partenaires de *Pml*, nous analyserons l'impact du stress oxydant (agression des cellules par des radicaux libres) en injection de molécules induisant ce stress. Afin que nos résultats soient statistiquement relevant, nous évaluons à 1848 le nombre de souris nécessaires à notre étude (9 nouveaux modèles murins comparés à des souris ayant le gène *Pml* normal ou n'exprimant pas ce gène, 7 conditions expérimentales testés, 8 souris par groupe ; 3 expériences indépendantes).

L'ensemble des souris (2370 souris) inclus dans ce projet sera surveillé quotidiennement par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs, selon des grilles d'évaluation permettant d'évaluer le bien-être des animaux. Lorsqu'une souris atteint un point limite préalablement défini, elle sera euthanasiée.

Tous les animaux seront euthanasiés au plus tard à l'âge de 18 mois.

14293 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent la première cause d'invalidité physique chez l'adulte et la troisième cause de décès à l'échelle nationale derrière l'infarctus du myocarde et les cancers. Les causes possibles de l'apparition d'AVC sont diverses et comprennent : l'hypertension, les maladies artério-veineuses, l'hypercholestérolémie, les embolies pulmonaires ou encore la présence de tumeurs. Il s'agit d'une pathologie moderne du fait de l'augmentation de sa fréquence corrélée à notre mode de vie actuelle (alimentation, pollution, sédentarité, stress, tabac.). L'organisation mondiale de la santé (OMS) considère les AVC en tant que pandémie et les prévisions pour 2030 annoncent près de 12 millions de morts victimes d'AVC. L'AVC peut être classé en deux catégories selon son origine qui peut être ischémique (80%) ou hémorragique (20%). Dans tous les cas de figure, il s'agit d'une perturbation vasculaire qui conduit à une mort neuronale massive dans le territoire cérébral irrigué par le vaisseau sanguin concerné. Les conséquences neurologiques délétères très souvent associées aux AVC ischémiques ne sont pas prises en charge. En effet, il n'existe aucun traitement curatif sur le plan neurologique à la suite d'un AVC ischémique de plus l'état de santé des patients nécessite un suivi médical important avec un coût élevé. Le traitement des AVC, notamment ischémiques, constitue donc un enjeu de santé public majeur sur le plan socio-économique. Actuellement, le seul traitement reconnu et validé par

l'OMS contre les AVC ischémiques, est l'utilisation de l'activateur tissulaire du plasminogène, connu sous le nom d'alteplase (t-PA), cette enzyme va provoquer la résorption du caillot sanguin et ainsi rétablir un flux sanguin cérébral physiologique. La thérapie cellulaire pourrait être utilisée en complément du t-PA pour le traitement des AVCs. Parmi les nombreux candidats cellulaires possibles, l'un d'entre eux semble particulièrement intéressant : les cellules souches olfactives (CSO). Ces dernières ont été largement décrites depuis le début du siècle et de nombreuses études ont mis en évidence leur rôle bénéfique dans différents modèles pathologiques. De ce fait, nous nous proposons d'évaluer le potentiel thérapeutique des CSO dans un modèle rat d'amnésie induit par ischémie cérébrale globale (ICG). Afin de réaliser l'ICG, nous procéderons au modèle d'occlusion des quatre vaisseaux (4VO) puis nous réaliserons des acquisitions par imagerie afin d'évaluer l'efficacité des lésions. Les conséquences neurologiques du 4VO seront évaluées, avant et après greffes, au niveau comportemental grâce aux tests de discrimination olfactif associatif et du Water maze. Enfin, des analyses électrophysiologiques et histologiques seront effectuées dans le but d'étudier le devenir des CSO ainsi que leur impact sur les atteintes cérébrales. Pour notre étude globale d'une durée totale de 3 ans selon les sous parties du projet, nous envisageons d'utiliser un nombre de 180 rats Sprague Dawley mâles (OFA) répartis en 3 groupes de 60 rats par an. La douleur, la souffrance et l'anxiété seront diminuées à leur maximum en utilisant des anesthésiques (local et général) et analgésiques appropriés suite aux différentes chirurgies. Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau jusqu'au jour de l'intervention à l'exception des périodes de comportement où une restriction hydrique aura lieu. Les animaux seront placés dans des conditions d'hébergement enrichies. Un délai minimum d'une semaine sera respecté entre la réception des rats et la date de la chirurgie. Comme de par le passé tout sera mis en œuvre pour réduire au minimum le nombre d'animaux et permettre d'appliquer aux résultats obtenus des comparaisons de moyenne (analyse de variance). Les lots d'animaux utilisés seront constitués, au minimum de huit rats. Aucun remplacement n'est possible actuellement dans ce type d'expérimentations.

14294 Rôle de l'histamine dans le contrôle des cataplexies, un symptôme majeur de la narcolepsie de type 1

Mots clés: sommeil, narcolepsie, vigilance, cataplexie, histamine.

Durée du projet: 5 ans. Type de projet : Recherche fondamentale.

Nombre d'animaux nécessaires : 190 souris.

Le projet contient trois procédures. Le degré de sévérité, estimé modéré, est de par la présence d'une intervention chirurgicale en début de chaque procédure. Toutes les étapes suivantes n'induiront aucune souffrance à l'animal. Néanmoins, un suivi du bien-être de l'animal sera réalisé quotidiennement sur toute la durée des procédures.

La narcolepsie est une maladie neurologique rare, chronique, qui se caractérise par une hypersomnolence pendant la journée et des crises de cataplexie. Nous avons montré que la cause pathologique est la mort d'un groupe de cellules nerveuses spécifiques, probablement consécutive à une attaque auto-immune.

Les patients atteints de narcolepsie ont une qualité de vie très dégradée. Selon les études les plus récentes, 58% d'entre eux sont sans emploi et 43% de ces patients incriminent leur perte d'emploi à leur maladie.

Les cataplexies sont des pertes soudaines de tonus musculaire provoquées, pendant l'éveil, par une émotion forte positive comme le rire ou la surprise. Les crises de cataplexie se traduisent parfois par la chute de la personne. Ces chutes peuvent être brutales et conduire à des blessures graves.

Peu d'options de traitements sont disponibles à ce jour. Un nouvel agent pharmacologique qui semble réduire le déclenchement des cataplexies, sans toutefois les supprimer totalement, est en cours de mise sur le marché. Il permet l'augmentation de la libération d'histamine dans le système nerveux central. Cependant, le mécanisme d'action mis en jeu est inconnu. Il est pourtant essentiel de découvrir son mode d'action et ses cibles cérébrales afin de potentialiser son effet pour une meilleure efficacité de traitement tout en évitant les éventuels effets secondaires.

Dans ce contexte, notre objectif est de déterminer la structure cérébrale efficace ciblée par l'agent pharmacologique et identifier les mécanismes cellulaires mis en jeu.

Notre projet est d'une grande pertinence clinique pour le développement de traitements pharmacologiques ciblés et efficaces dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients et réduire le coût sociétal de cette pathologie.

Nous répondrons explicitement aux principes et exigences des 3R :

Remplacement: Nos travaux seront conduits chez la souris, un modèle reconnu de narcolepsie de type 1 exprimant l'hypersomnolence diurne, la fragmentation du sommeil et les cataplexies. Les réseaux neuronaux responsables du sommeil et de l'éveil que nous ciblons sont communs aux mammifères, incluant les rongeurs et l'homme. Ils sont aujourd'hui bien identifiés.

Réduction: Le nombre d'animaux prévu est légitimé par l'organisation de l'étude autour de trois procédures expérimentales indépendantes. Il tient compte des erreurs et échecs aux différentes étapes des procédures appliquées aux animaux. Pour la durée complète du projet, il est prévu un total de 190 animaux, répartis en 5 lots expérimentaux. La taille respective des lots a été calculée de manière à ne pas compromettre les objectifs scientifiques et la significativité des données (petits échantillons).

Raffinement: Par notre expérience d'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques, nous sommes conscients que l'étude du sommeil qui constitue notre corps de métier au laboratoire requiert des animaux constamment placés dans les meilleures conditions psycho-physiologiques. Les cataplexies ne s'expriment que si les souris, comme les humains, sont dans des conditions de bien-être. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les procédures expérimentales sont d'ores et déjà maîtrisées. Les expérimentations seront réalisées par des personnes compétentes, formées et suivies dans leur carrière dans le cadre de leur formation continue à l'expérimentation animale.

14295 -Contexte :

Le sepsis est un syndrome clinique complexe. En réponse à une infection suspectée ou prouvée, le système immunitaire inné s'active de manière incontrôlée. Il existe deux phases établies pouvant se recouper. La phase initiale dite hyperdynamique se caractérise par une production massive de cytokines proinflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène par les macrophages et neutrophiles. Cette phase conduit à une nécrose tissulaire et une insuffisance des organes. La seconde phase est hypodynamique avec une présentation antigénique altérée, une diminution de la prolifération et de la fonction lymphocytaire et une augmentation de l'apoptose.

-Objectif scientifique :

Les agents antimicrobiens pathogène-spécifiques restent un élément clé du traitement du sepsis en complément de la gestion des symptômes. La physiopathologie de cette maladie encore mal comprise explique l'échec des thérapies contre le sepsis. Nous avons donc pour but non seulement d'étudier la physiopathologie de ce syndrome mais également de proposer une thérapie efficace.

PROCEDURE

La génération du modèle de sepsis par ligature et perforation du caecum nous permettra de tester les effets de substances pharmacologiques (Guanabenz, Sefhin-1 et Inhibiteur Casein Kinase II) sur un modèle pertinent de sepsis qui imite le phénotype du sepsis humain.

-Retombées attendues :

Après avoir montré que l'administration de Guanabenz *in vivo* peut protéger la souris d'une activation non contrôlée de l'immunité innée, nous avons donc pour but de tester le potentiel effet thérapeutique du Guanabenz, de Sefhin1 et d'un inhibiteur de la Casein Kinase II dans la péritonite polymicrobienne chez la souris comme modèle pertinent de sepsis humain.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

L'effet de ces substances pharmacologiques devra être testé dans un modèle animal pertinent ce qui nous permettra en parallèle de comprendre la physiopathologie de cette maladie. Nous utiliserons alors un modèle murin de ligature et perforation du caecum afin d'appréhender la

physiopathologie du sepsis avec un traumatisme tissulaire engendrant une ischémie et une infection polymicrobienne. Les souris seront hébergées par 5 dans des cages de 530cm².

REMPACEMENT

Dans notre laboratoire, nous avons préalablement réalisé des expériences *in vitro* dans le but de remplacer le modèle animal. Néanmoins afin de confirmer nos résultats, il était nécessaire de justifier l'utilisation d'une thérapie potentielle dans un modèle animal.

REDUCTION

La réduction du nombre d'animaux est possible selon deux points essentiels.

Tout d'abord, nous avons voulu confirmer dans un modèle d'endotoxémie qui est un modèle de sepsis avec de nombreuses limitations. Au vu de nos résultats obtenus par cette précédente étude, nous souhaitons à présent utiliser un modèle plus complexe mais plus fidèle du sepsis humain. Cependant, avant de démarrer une étude lourde comprenant une multitude d'animaux, nous souhaitons commencer par cette étude pilote qui nous permettra de réduire notablement le nombre d'animaux nécessaire dans l'étude principale qui sera lancée dans un second temps.

De plus, la réduction du nombre d'animaux est également possible grâce à une étude bibliographique approfondie. Nous avons alors pu évaluer la puissance statistique des différents paramètres que nous souhaitons étudier dans cette étude pilote. Nous avons ainsi pu réduire de manière stringente le nombre d'animaux à utiliser.

RAFFINEMENT

Afin de déterminer le plus précocément possible le point limite avant euthanasie, 8 souris seront utilisées. Seule une chirurgie sera réalisée avec administration d'analgésique. Ces souris permettront l'ajustement de la grille de score nécessaire à l'établissement d'un seuil de douleur, souffrance et angoisse à ne pas dépasser.

La chirurgie sera réalisée sous anesthésie et analgésie. De plus, une injection d'analgésie aura lieu deux fois par jour afin de limiter toute douleur, souffrance et angoisse des animaux. La mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel ainsi que le suivi quotidien de l'état de santé des animaux permettront le raffinement de ce projet. En outre, des dômes en cellulose protecteurs de la lumière et du coton pour confectionner des nids sont rajoutés comme enrichissement dans les cages. Afin de limiter les cas de déshydratation, une solution physiologique pourra être injectée en sous-cutanée. Une évaluation de l'état inflammatoire de la souris sera réalisée *in vivo* par bioluminescence.

Dès lors qu'un animal aura atteint un point limite énoncé dans le 3. 4. 13, la souris sera euthanasiée dans le but de réduire toute douleur, souffrance et angoisse des animaux. Une grille de score a été établie afin de mesurer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Ainsi, si le score atteint 10 points, l'animal sera euthanasié.

Nombre total d'animaux inclus dans le projet :

En conclusion, un nombre total de 120 souris C57BL/6 J sera utilisé lors de ce projet.

14296 Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour la glycogénose de type III (GSD III).

GSD III est une maladie rare caractérisée par une dégénérescence progressive du foie et des muscles. La fréquence de la maladie est de 1/100000. GSD III est une maladie autosomale récessive due à l'absence de l'enzyme de débranchement du glycogène (GDE), enzyme clé dans la dégradation du glycogène, molécule de stockage du glucose.

La maladie se présente en deux phases successives : une phase juvénile puis une phase adulte. Les malades présentent un élargissement du foie (hépatomégalie), une hypoglycémie, une hyperlipidémie et un retard de croissance. Chez l'enfant la GSDIII affecte principalement le foie. Sans un régime alimentaire approprié les conséquences sont fatales. Avec l'âge les symptômes évoluent. Chez l'adulte, la maladie a principalement un phénotype musculaire dégénératif alors que le phénotype hépatique s'estompe. Néanmoins, dans les cas les plus sévères, les patients adultes

peuvent développer une cirrhose qui conduit à l'apparition d'adénomes hépatiques et de carcinomes, nécessitant une transplantation.

Actuellement, il n'y a pas de traitement pour le phénotype musculaire de la GSDIII mais un régime riche en glucides complexes et en protéines peut ralentir l'évolution de la myopathie.

Le but de notre projet est de développer une approche de transfert de gène permettant aux cellules des patients atteints de GSDIII de recréer la protéine GDE manquante. Cette approche vise aussi bien les enfants (phénotype métabolique) que les adultes (phénotype musculaire).

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos virus médicament ont préalablement été testés *in vitro* (Réduction) et seuls ceux ayant montré l'expression de la protéine GDE la plus importante seront utilisés *in vivo*. Toutefois la capacité de nos virus à franchir les défenses immunitaires et à induire une correction concomitante des muscles et du foie ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier", rendant l'utilisation du modèle animal indispensable. Nous prévoyons donc de les tester chez le modèle animal murin qui mime le phénotype musculaire et métabolique de la maladie. Nous prévoyons ainsi de tester nos hypothèses thérapeutiques sur un modèle de souris (souris GDE-KO) présentant les mêmes déficiences que celles observées dans les patients atteints de GSDIII.

Ces études utiliseront le minimum d'animaux possible estimé en fonction d'une analyse statistique prédictive (test de comparaison des moyennes) afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible (Réduction). Nous envisageons ainsi l'utilisation d'un total de 170 souris sur 5 ans. De plus, nous évaluerons le maximum de paramètres requis sur les mêmes animaux après leur mise à mort dans la même expérience pour limiter leur nombre.

Les prélèvements sanguins seront importants pour évaluer l'efficacité de nos vecteurs et seront fait sous anesthésie gazeuse afin de limiter le stress chez les animaux (Raffinement). Nous espérons ainsi montrer au terme du projet une efficacité thérapeutique de notre meilleur candidat chez la souris permettant la preuve de concept de thérapie génique pour GSDIII. Nous espérons aussi montrer que la séquence humaine est efficace et permettra d'initier un développement clinique de notre produit.

14297 Le but de ce projet est d'assurer, conformément aux exigences de la réglementation sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la formation du personnel aux techniques pratiquées par le laboratoire de recherche, et d'assurer la formation continue qui permet de maintenir à niveau les compétences de chacun.

La formation est réalisée sous la responsabilité du responsable de formation qui s'assure du respect des recommandations internationales publiées et du respect du bien-être et du confort des animaux.

Les espèces concernées sont des rongeurs (souris, rats, cobayes) et des lapins : l'espèce utilisée et le type d'actes réalisés reflètent ceux qui sont effectués au cours de nos études. Le projet comporte 4 procédures : les 2 premières procédures correspondent aux administrations de substances et aux prélèvements chez les rongeurs et les lapins, la 3ème procédure correspond à une formation à la chirurgie sous anesthésie sans réveil, et la 4ème procédure correspond à une formation à la chirurgie en prévoyant le réveil des animaux. Sont incluses dans les 2 premières procédures les formations à l'anesthésie et à l'euthanasie. Chaque technique est apprise séparément et un superviseur s'assure que chaque personne valide son apprentissage jusqu'à l'autonomie.

La démarche de remplacement est prévue en utilisant des documents et dans la mesure du possible des supports vidéos. Ce projet utilisant des animaux vivants reste nécessaire dans le but d'approfondir cette compétence technique et de former aux espèces et aux actes particuliers prévus dans les études en intégrant la prise en compte des réactions et comportement des animaux.

Pour assurer la formation d'environ 50 personnes pour les rats/souris et d'environ 20 personnes pour les lapins/cobayes, ce projet utilisera au maximum 160 souris par an, 500 rats par an, 50 lapins par an et 6 cobayes par an (soit au maximum sur 5 ans : 800 souris, 2500 rats, 250 lapins et 30 cobayes). Le nombre pour chaque espèce est ajusté au minimum nécessaire pour tenir compte des besoins d'acquérir une compétence technique validée, pour l'ensemble des techniques

nécessaires, et à plusieurs âges des animaux. La démarche de réduction est prévue en optimisant le nombre d'animaux, tout en limitant cependant le nombre d'actes sur un même individu.

Dans la mesure du possible, les animaux utilisés sont issus d'un projet précédent et non commandés seulement pour la formation. Cependant, il est possible dans certains cas, en vue d'un projet spécifique, que les animaux utilisés soient commandés pour la formation.

Dans un souci de raffinement, toutes les techniques seront enseignées selon des méthodes recommandées et visées par la Structure de Bien-Etre Animal pour minimiser l'impact sur l'animal et avec une surveillance accrue des points limites. Les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum, et une anesthésie (normalement pas nécessaire pour des gestes peu invasifs) pourra être envisagée en début d'apprentissage.

L'hébergement est conforme aux recommandations en vigueur. Les animaux disposent d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de leur environnement. Notre standard est de socialiser les animaux sauf exceptions. En post-chirurgie, les animaux seront ou non socialisés selon le type d'intervention réalisée. De plus, pour éviter les bagarres, les souris mâles et les lapins matures sexuellement sont maintenus isolés. Enfin, les femelles gestantes sont également maintenues isolées. Dans ces cas d'isolement, les animaux restent en contact visuel, auditif et olfactif avec des congénères et ont accès à un enrichissement de l'environnement.

Les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum.

14298 L'insuffisance rénale chronique (IRC) correspond à des atteintes rénales qui le plus souvent évoluent vers une fibrose favorisant la lésion des tubules rénaux. Ces lésions entraînent la perte de la fonction rénale. Cette maladie dont la prévalence est de 1 patient sur 1000 habitants s'avère donc un enjeu de santé publique. Parmi les acteurs associés à la progression de la fibrose rénale, le récepteur nucléaire Farnesoid X receptor a été identifié comme une molécule pouvant protéger de cette atteinte. En effet, son absence promeut la fibrose chez les souris et l'étude de biopsies humaines a permis de montrer que la diminution de FXR précède et permet de prédire l'apparition d'IRC.

Ce projet vise à évaluer l'efficacité d'une molécule agoniste de FXR dans un modèle de souris génétiquement modifié chez lequel nous pouvons induire une fibrose rénale contrôlée dans le temps. L'induction de la fibrose se fera par gavage au tamoxifène des souris ce qui entraîne l'inactivation du facteur de transcription Hnf1beta. Les souris seront ensuite gavées avec soit la molécule agoniste de FXR, soit avec un placebo pour une durée de 21 jours.

Un prélèvement de sang en intracardiaque sera réalisé sous anesthésie générale afin d'éviter la souffrance et l'angoisse avant le sacrifice des animaux 24 jours après l'inactivation du gène. L'urine et les reins des animaux seront prélevés en post-mortem pour analyses.

Afin de respecter le principe des 3R, la molécule agoniste a déjà été testée sur des cultures cellulaires et nous permet d'envisager une gamme d'efficacité sans toxicité pour les animaux. Nous réduisons ainsi le nombre d'animaux nécessaires. D'autre part, il a été démontré que la validité de l'analyse statistique de la biochimie sanguine et urinaire requiert un minimum de 20 animaux par groupe. C'est donc cette valeur que nous nous sommes fixée pour cette étude. Tout au long de la procédure, les animaux seront surveillés et des points limites ont été établis permettant d'anticiper la mort de l'animal en cas de souffrance. Cette étude implique 140 souris.

Cette étude vise à atténuer voire à inverser la fibrose rénale induite chez un modèle génétique murin et représente un enjeu thérapeutique quant au traitement de l'insuffisance rénale chronique.

14299 Le Toll-like-récepteur-3 (TLR3) est exprimé par les cellules immunitaires et épithéliales ainsi que tous les cancers épithéliaux. Le concept du TLR3 comme cible anticancéreuse existe depuis près de 30 ans, même si leur mécanisme exact n'est connu que depuis peu. En effet, l'activation de ce récepteur entraîne la mort spécifique des cellules cancéreuses (mais pas des cellules normales), ainsi qu'une inflammation ayant un effet antitumoral. L'ensemble de ces deux effets devant induire à terme une vaccination contre la tumeur.

Malgré cette efficacité clinique, aucun activateur de ce récepteur n'a jusqu'ici obtenu l'autorisation de mise sur le marché en raison de manque d'homogénéité (taille, structure et séquences), d'effets toxiques ou de manque d'efficacité. Une nouvelle famille de ligands de ce récepteur a récemment été découverte (dont le candidat médicament de cette étude), homogènes, actifs, spécifiques et très peu toxiques.

Une étude pilote, preuve de concept de l'efficacité de ce nouveau candidat médicament, a été menée récemment sur un modèle de cancer de la vessie avec des résultats très encourageants. Une espérance de vie moyenne allongée de plus de 6 fois par rapport au groupe control, dont plus d'un tiers de rémission totale ayant induit une vaccination contre la tumeur, le tout avec une très bonne tolérance du traitement.

Cependant, ces effets ont été démontrés en utilisant un protocole non optimisé, ni en termes de fréquences, ni en termes de doses, de façon à être transposables chez l'homme pour une future étude clinique.

Ce projet consiste donc à optimiser le protocole de traitement de ce candidat médicament pour une utilisation clinique, seul ou en combinaison. Il s'articulera autour de 5 procédures séquentielles.

-La première étape de ce projet sera donc d'optimiser les fréquences de prise de traitement par rapport à l'activité antitumorale et autovaccinale du candidat médicament, en comparant directement les effets de 3, 2 et 1 prises par semaine.

-La seconde étape de ce projet consistera à déterminer les doses efficaces en utilisant la meilleure fréquence déterminée dans la première étape.

-L'ensemble des expériences précédentes n'ayant été effectuées que sur des souris femelles (ayant des tumeurs réputées plus agressives), un protocole permettra de comparer directement les effets du sexe (hormones), sur le traitement, en utilisant les fréquences et doses préalablement déterminées, sur des groupes de souris mâles et de souris femelles.

-L'efficacité de ce candidat médicament pouvant être améliorée par une combinaison avec un anticorps : les souris seront traitées avec le médicament candidat et l'anticorps. L'effet antitumoral direct et l'efficacité autovaccinale seront analysés

-Enfin, les effets antitumoraux et autovaccinaux du candidat médicament en monothérapie seront comparés à celui du traitement de référence (le B. C. G.). Ces effets seront également analysés en traitant les souris avec le candidat médicament et le BCG.

L'ensemble des 5 procédures du projet inclura au maximum 940 souris.

Tout au cours de ce projet, l'ensemble des précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal.

- La « réduction » du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats sera respectée en utilisant les méthodes statistiques adaptées aux petits nombres. Chaque expérience concluante sera répétée au maximum une fois et si possible en l'intégrant dans les contrôles de l'expérience suivante.

- Le « Raffinement » sera respecté par la mise en place d'une définition précises de points limites précoces et prédictifs (avec un système de score élaboré grâce à l'étude pilote). Une surveillance adaptée des animaux 3 fois par semaine permettra d'éviter toute souffrance des animaux. Les actes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale après administration d'un analgésique. De nombreuses analyses seront réalisées sur les différents prélèvements pour documenter et obtenir le maximum d'informations sur ces modèles précliniques.

- Ces expériences sur petits animaux ne peuvent pas être remplacées. Seul un modèle in-vivo sera à même de mimer l'efficacité antitumorale et autovaccinale de ce candidat médicament au cours des différentes étapes de la progression tumorale.

Ce projet s'inscrit donc dans le cadre de développement d'une application thérapeutique applicable chez le patient.

14300 Dans un contexte de réchauffement climatique, nos travaux précédents et d'autres ont montré une amélioration de la capacité d'adaptation des poulets de chair à des environnements chauds par l'exposition des embryons à des augmentations de température pendant l'incubation des œufs. Ce traitement, appelé thermo-manipulation embryonnaire (TM), semble également améliorer la survie des cailleteaux lors des premiers jours de vie s'ils sont exposés à une augmentation de température. Par ailleurs, nous avons pu montrer dans le précédent projet que la TM a un effet sur le poids des cailles japonaises (baisse de la masse corporelle des animaux ayant reçu le traitement jusqu'à 35 jours d'âge) qui est transmis aux descendants bien qu'ils ne soient pas ré-exposés au traitement: on parle d'effet transgénérationnel. La caille a été choisie car cette espèce modèle très proche du poulet présente l'avantage d'un intervalle de génération court. Les phénomènes transgénérationnels induits par l'environnement étant transitoires, nous cherchons à déterminer pendant combien de génération cette différence de masse peut être détectée en l'absence d'une nouvelle stimulation. Dans ce projet, notre objectif est d'élever trois groupes de cailles japonaises issues du précédent projet (un ayant reçu la TM pendant 4 générations, un groupe l'ayant reçu pendant deux générations puis deux générations sans TM, et un groupe témoin qui n'a jamais reçu de TM). Nous étudierons la masse des individus et les caractères de reproduction au cours de 3 générations supplémentaires, étant donné que l'effet est censé s'estomper dans ce laps de temps générationnel. Aucune procédure de traitement embryonnaire ne sera réalisée pendant ces trois générations supplémentaires et les conditions de démarrage d'élevage jusqu'à 8 semaines d'âge seront standard (au sol, en groupe). Une procédure d'hébergement des couples en cage de 0,235 m² pour mesure de ponte et collecte des œufs pour 3 générations concernera 20 couples d'animaux par groupe et génération, soit un total de 360 animaux. Cet hébergement en couples est nécessaire pour la mesure et collecte d'œufs en pedigree et pour maintenir les mêmes conditions d'hébergement que pour les générations précédentes.

Remplacement: La question biologique posée sur la nature de la réponse thermique transgénérationnelle de la masse d'un animal et de caractères de ponte sur plusieurs générations nécessite l'utilisation d'animaux vivants et exclut la possibilité de réaliser ces expériences sur des lignées cellulaires ou organoïdes.

Réduction: Le nombre d'animaux utilisés est nécessaire et suffisant pour suivre le caractère transgénérationnel d'intérêt selon notre calcul statistique de puissance. Le nombre d'animaux mis en lignée est nécessaire pour assurer un brassage génétique non frère-sœur permettant de limiter la consanguinité.

Raffinement: Tout animal atteignant le point limite défini au préalable sera sorti de l'expérimentation. Les animaux sont démarrés en groupe au sol en conditions enrichies par la présence de copeaux, de congénères et de radiodiffusion. A partir de 7 semaines d'âge, les animaux sont hébergés en couples dans des cages enrichies : jouet (balle), radiodiffusion, présence de congénères.

14301 Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes. Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de poly-chimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux ». Les cellules tumorales induisent la production de facteurs activateurs des ostéoclastes qui vont dégrader l'os. Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle libère des facteurs de croissance qui à leur tour vont activer la prolifération des cellules tumorales.

Ce projet porte sur le développement d'une approche thérapeutique originale par l'utilisation de plasma à gaz ionisé. Ce dispositif expérimental est déjà connu pour cibler préférentiellement les

cellules tumorales *in vitro*, laissant intactes les cellules stromales. Cette approche sera testée *in vivo* dans le modèle murin syngénique d'ostéosarcome C57BL/6JRj.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et l'éventuelle application clinique, et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vivo*. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par groupe, à raison de 7 groupes correspondant à divers modes d'exposition au plasma, soit un total de 56 animaux par expérimentation. Les expérimentations seront répétées 1 à 2 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés. Un total de 168 souris immunocompétentes est donc nécessaire sur une période de 1 an.

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

Afin de raffiner les procédures expérimentales, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocément possible tout signe de douleur. Les animaux anesthésiés seront placés sur un tapis chauffant lors de la réalisation des gestes techniques, et une analgésie sera appliquée dès que nécessaire.

14302 L'autisme, le retard mental et la schizophrénie sont des maladies du développement du cerveau, qui influencent grandement les capacités intellectuelles des individus affectés ainsi que leur insertion sociale, représentant donc une charge importante pour les familles et pour la société en général. Ces pathologies sont souvent associées à un défaut d'organisation et à un nombre anormal des connexions établies entre les cellules nerveuses, qui se manifeste chez les jeunes enfants au cours du développement du cerveau. Il est apparu récemment que des mutations génétiques pouvaient en être responsables. Certaines de ces mutations concernent des protéines qui permettent la formation et le maintien des connexions neuronales, en particulier, les Neurologines. En effet, des mutations génétiques des neurologines ont été associées aux troubles du spectre autistique.

Dans ce projet, nous voulons comprendre le rôle des neurologines au niveau des connexions entre neurones, dans le but de produire un éclairage nouveau sur les troubles du spectre autistique. Nous avons récemment mis au point un nouveau procédé par lequel il est possible de contrôler de façon très précise le fonctionnement des neurologines et la formation de connexions entre neurones dans des systèmes de cultures cellulaires. Cette approche nous permet notamment de stimuler la formation de nouvelles connexions via des stimulations lumineuses et de mimer en partie les événements qui se produisent dans certaines maladies comme l'autisme (notamment le maintien d'un nombre anormalement élevé de connexions).

Nous sommes allés aussi loin que nous pouvions en utilisant des systèmes *in vitro* afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. Nous avons maintenant besoin de faire des tests chez des animaux vivants, pour extrapoler plus tard à ce qui se passe chez l'homme. Nous voulons ainsi appliquer nos méthodes d'activation lumineuse à des souris de laboratoire, pour tester leurs effets sur l'activité neuronale et la mémoire. Ceci nécessite de faire exprimer une molécule sensible à la lumière dans le cerveau grâce à des outils génétiques, d'apporter une source de lumière dans la région cible, puis d'enregistrer l'activité neuronale ou tester les capacités mnésiques. Nous espérons que notre approche permettra ainsi de mieux comprendre les déséquilibres de communication entre neurones lors des troubles de l'autisme. Pour mener à bien ce projet les approches expérimentales principalement utilisées seront : 1) des enregistrements de l'activité électrique des neurones *in vivo* couplés à la manipulation des neurologines par la lumière, et 2) des analyses du comportement des souris lors d'une tâche d'apprentissage spatial. Nous espérons que notre approche permettra ainsi de mieux comprendre les déséquilibres de communication entre neurones lors des troubles de l'autisme.

Le déroulé expérimental sera le suivant 1) une chirurgie stéréotaxique pour faire exprimer la molécule sensible à la lumière dans la région cérébrale cible 2) après récupération complète, des approches en électrophysiologie *in vivo* couplées à la manipulation de l'activité des neurones par la lumière, sur animaux anesthésiés pour certains et 3) des tests de comportement de mémoire spatiale pour d'autres.

Les résultats obtenus chez la souris C57B/6J seront comparés avec ceux obtenus chez la lignée transgénique qui n'exprime plus la Neurologine 1. Cette lignée utilisée de longue date en neurosciences ne montre pas de phénotype nocif.

- Remplacement :

Le maximum de résultats sur la validation du mécanisme cellulaire a déjà été obtenu avec des cultures de cellules ou de tissus ainsi qu'avec des approches de simulations numériques *in silico*, et le projet nécessite maintenant l'utilisation d'animaux vivants pour valider l'approche de stimulation par la lumière sur l'activité neuronale *in vivo* et la mémoire spatiale. Il nous faut notamment travailler avec des animaux se comportant pour pouvoir effectuer les tests de mémoire.

- Réduction :

Tous les efforts seront portés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et de raffiner les approches utilisées afin de préserver au mieux leur bien-être durant les procédures. Le nombre total d'animaux requis pour ce projet est de 480 souris sur 5 ans. Ce nombre sera réduit au minimum grâce à des groupes pilotes qui permettront une optimisation des paramètres de nos expériences.

- Raffinement :

Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels : petits groupes sociaux (maximum 5 souris par cage), cages enrichies d'éléments pour construire un nid ou de favoriser l'exploration (litière, petites maisons ou tunnels en carton, frisures de papier). Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement selon des critères objectifs. La douleur provoquée par la chirurgie sera soulagée efficacement en utilisant des molécules adaptées (morphinique, anti inflammatoires). Pour les expériences de comportement, chaque souris sera habituée à l'expérimentateur et à l'enceinte de test, pendant au moins 3 jours avant le début des tests, pour limiter le stress des manipulations. Le test utilisé a pour but de mesurer la mémoire spatiale des animaux à trouver une source d'eau. La restriction hydrique à laquelle sera soumis les animaux pour les motiver sera étroitement contrôlée, afin que l'animal ne montre aucun signe de souffrance. Une fiche de suivi individuel de l'évaluation du bien-être sera créée pour chaque procédure expérimentale. A partir des critères définis dans ces fiches, des points limites précoces seront établis pour éviter de prolonger toute souffrance.

De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. Le suivi quotidien des animaux est assuré par des techniciens formés au bien-être des animaux. La mise à mort des animaux en fin d'expérimentation sera nécessaire pour prélever leur cerveau et faire l'analyse post-mortem des tissus cérébraux. Cette procédure sera réalisée par des expérimentateurs compétents et soucieux du bien-être animal, sous anesthésie profonde avec le degré d'analgésie recommandé par les services vétérinaires. Si des animaux atteignent des points limites nécessitant une décision de mise à mort, elle sera indolore, avec une perte de conscience rapide.

14303 CONTEXTE

Dans le cadre de traitement focalisé sur le foie en condition expérimentale, les mouvements respiratoires représentent une contrainte non négligeable. Lorsque le traitement dure trop longtemps, le maintien en apnée de l'animal n'est pas possible. Le principe de ventilation assistée classique calque la respiration spontanée. Un remplissage des poumons est effectué environ 15 fois par minute. Deux autres principes ont été créés, permettant l'apport suffisant en oxygène mais avec des fréquences différentes :

- La jet ventilation : de l'air sous pression est envoyé à haute fréquence (jusqu'à plusieurs centaines de fois par minutes) à travers une sonde de petit calibre. Le dioxyde de carbone (CO₂) est expulsé

de façon passive. Cette technique présente un intérêt en chirurgie maxillo-faciale et ORL car la sonde de petit calibre laisse libre les voies aériennes supérieures.

- La ventilation à percussions intrapulmonaires : Des impulsions de percussions d'air sont délivrées à hautes fréquences (de 60 à 400 cycles par minutes) par le biais d'une sonde d'intubation ou bien par un masque en suivant la respiration spontanée. Ici, l'évacuation du CO₂ n'est pas passive. Cette technique a été créée dans le but de laver les alvéoles des poumons et de mobiliser l'espace des alvéoles collabées dans le contexte de maladies bronchiques.

OBJECTIF

Notre objectif est de mettre en œuvre les deux principes de ventilation sur le modèle porc pour choisir la méthode qui nous permettra de raffiner les procédures effectuées au sein d'une plateforme expérimentale et d'améliorer les modèles d'étude mais également de mettre au point les réglages adaptés au modèle porcin.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de type recherche appliquée mettra en œuvre deux porcs. Chacun d'eux sera anesthésié, ventilé pendant 3 heures lors de deux sessions. Lors de la seconde session, une laparotomie sera effectuée afin d'affiner les paramètres de ventilation permettant de suffisamment limiter les mouvements du foie.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction : Deux porcs permettront de tester chaque principe sur deux porcs différents ce qui est le minimum afin de pouvoir s'affranchir de la variation liée à l'individu.

Raffinement : La mise au point des techniques de ventilation demande trop de temps pour le prévoir au début d'une anesthésie d'une procédure, c'est pourquoi un projet est prévu à cet effet. La mise au point des paramètres sera effectuée par le technicien de la société qui fournit l'appareil ce qui permettra de raccourcir et optimiser cette phase. Le CO₂ sera monitoré en plus de l'oxygène afin de suivre l'ensemble de la respiration.

Remplacement : La mise au point va être réalisée à partir des paramètres utilisés chez l'homme. Le passage chez l'animal est indispensable, le but étant ici de raffiner et optimiser le modèle animal mis en œuvre dans d'autres projets. Après la mise à mort les organes seront proposés à un réseau de chercheurs.

- 14304** Actuellement, la production d'embryons *in vitro* constitue une biotechnologie de la reproduction largement utilisée par les entreprises de sélection bovines afin d'accroître le progrès génétique sur les caractères d'intérêts fixés par la société (production de produits de qualité par des animaux résilients et durables). Cette technologie nécessite l'utilisation de produits d'origine animale dont du sérum issu de femelles au 3^{ème} jour du cycle œstral. L'objectif de ce projet est de produire un pool de 1000 ml de sérum à partir de 5 femelles donneuses prélevées au bon stade physiologique et dont la qualité sera ensuite éprouvée par des expériences de production d'embryons *in vitro*. Ce projet respecte la règle des 3R:

Remplacement: des projets de recherche sont aujourd'hui menés pour développer des milieux de culture exempts de produits d'origine animale mais les connaissances actuelles ne permettent toujours pas de s'en affranchir. Ainsi, le recours à l'animal reste obligatoire.

Réduction: Afin de s'assurer de la production d'un pool de sérum en quantité suffisante, un minimum de 5 femelles sera utilisé dans le cadre de ce projet.

Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales.).

- 14305** Plusieurs espèces ont la capacité de faire repousser un organe voire même un membre lorsque celui-ci est sévèrement blessé ou amputé. Cette capacité, nommée régénération, intrigue les chercheurs depuis de nombreuses années. Le poisson zèbre possède d'importantes capacités de

régénération à l'âge adulte. Contrairement aux mammifères, il peut régénérer des organes tels que le cœur, la moelle épinière ou la nageoire caudale. Il constitue donc un modèle de choix pour notre équipe qui s'intéresse aux signaux émis pendant les premières heures et nécessaires au processus de régénération de la nageoire caudale.

Notre étude comprend deux procédures correspondant aux objectifs suivants :

-dans cette première procédure, nous souhaitons identifier les signaux émis au cours de la régénération. Afin de répondre à cette question, les nageoires seront prélevées à différents moments après amputation puis analysées par des techniques d'observation en microscopie confocale ou par des analyses biochimiques. A la fin de cette procédure, les animaux seront gardés en élevage pour renouveler la lignée et obtenir des embryons ou permettront la constitution d'une banque d'organes.

-Dans la deuxième procédure, nous modulerons les signaux identifiés (augmentation ou diminution à l'aide de molécules ajoutées dans l'eau du bac). Nous analyserons les résultats en observant la forme des nageoires au cours de la régénération ainsi qu'en réalisant des observations au microscope confocale ou des analyses biochimiques.

Pour ce projet, nous avons besoin de 2800 poissons zèbre pour toute la durée de l'étude.

Concernant la règle des 3R, cette étude ne peut se faire avec des cellules en culture puisque nous nous intéressons à la régénération de la nageoire. De plus, celle-ci doit être en continuité avec le corps de l'animal pour régénérer. Nous avons calculé les effectifs de manière à garantir une fiabilité statistique suffisante tout en réduisant au mieux le nombre d'animaux. Pour finir, les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être.

Dans les deux procédures décrites ci-dessous, pour limiter la douleur et le stress des animaux, nous pratiquerons l'amputation sous anesthésie. Le comportement spontané (position dans le bac, activité), le comportement provoqué (appétit) et l'aspect extérieur des animaux en procédure seront suivis. Nous effectuerons un suivi journalier. Jusqu'à présent, aucun changement de comportement n'a été observé après lésion de la nageoire caudale. Ces procédures légères et très courtes n'affectent pas le pronostic vital des animaux. La mise en place d'un suivi journalier strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale.

14306 Le diabète représente aujourd'hui la plus fréquente des maladies chroniques puisqu'elle touche près de 6 % de la population. Le diabète est une maladie métabolique qui se caractérise par un excès du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie). Actuellement le patient diagnostiqué et pris en charge dispose de nombreuses propositions thérapeutiques plus souples d'utilisation et l'innovation pharmacologique est au cœur des progrès dans le traitement du diabète. Cependant au fil du temps, un diabète mal surveillé et mal géré peut entraîner des conséquences dont les plus fréquentes et les plus connues sont la cécité et les amputations des extrémités (doigts et orteils) ou des membres. Ces complications semblent être induites par la détérioration et l'obstruction des petits vaisseaux ou la dégénérescence des nerfs. Cette atteinte des nerfs est classiquement appelée neuropathie. Par ailleurs, les données de la littérature concernant la prévalence de la surdité chez les patients diabétiques (de type 1) sont contradictoires. Selon une récente méta-analyses, la prévalence de la surdité serait évaluée entre 5. 17% et 48% chez les patients diabétiques de type 1. Une autre étude clinique ne révèle aucune différence significative de la prévalence de la surdité chez les patients diabétiques de type 1 comparativement aux sujets non diabétiques. Les outils d'exploration audiolologiques sont-ils assez sensibles pour détecter l'installation d'une atteinte auditive subtile ? De nombreuses études pré-cliniques ont révélé que des pertes massives de cellules ciliées internes, ou de fibres nerveuses pouvaient être sans conséquence sur les seuils liminaires (seuils de détection, déterminés par l'audiométrie). L'atteinte auditive chez les patients diabétiques pourraient donc être sous-estimées car mal évaluée. Il semble donc indispensable de documenter du point de vue fonctionnel et histologique plus précisément sur des modèles murins cette complication « silencieuse » du diabète. Pour cela, notre projet de

recherche examinera l'impact du diabète induit sur la fonction auditive sur deux souches de souris : la souris de souche CBA/J Rj (ayant une fonction auditive stable sur près de 2 ans) et la souris de souche C57Bl/6J Rj (souris présentant une dégradation de sa fonction auditive dès le 2ème mois de vie, modèle de surdité liée à l'âge ou presbycusie). Le diabète sera induit chez ces 2 souches de souris par une injection intrapéritonéale de streptozotocine, induisant ainsi un diabète de type 1. Dans un premier temps ce projet examinera sur 20 souris (10 animaux par souche) la cinétique d'installation du diabète. Une fois cette étape réalisée nous étudierons l'impact du diabète sur la fonction auditive (15 animaux diabétiques par souches -soit 30 animaux- et 10 animaux témoins par souches - soit 20 animaux). Une attention particulière sera portée à l'état de santé général des animaux avec une induction de diabète: une perte de poids supérieur à 20% du poids corporel initial, une attitude inhabituelle traduisant un mal-être.

14307 Les cellules dendritiques (DC) sont les sentinelles de notre système immunitaire : elles sont capables de détecter un danger (cellules anormalement transformées pouvant conduire à l'émergence de cancer), et d'en instruire les lymphocytes qui ont la capacité de détruire les cellules concernées. Les DC représentent une population très très rare des cellules immunitaires chez l'homme. Pourtant elles sont de puissantes activatrices de nos réponses immunitaires. Les cDC1 sont retrouvées dans certaines tumeurs qui répondent bien à des traitements antitumoraux classiques (radiothérapie, chimiothérapie) et des immunothérapies. Quand leurs fonctions sont activées en combinaison avec ces traitements anti-tumoraux, les DC augmentent l'effet thérapeutique des traitements, et les tumeurs régressent plus rapidement. En fait, les DC sont naturellement capables de se relocaliser dans les ganglions drainants les tumeurs et d'activer efficacement lymphocytes anti-tumoraux. C'est pourquoi les DC sont devenues centrales dans la recherche clinique anti-tumorale. Cependant, de nombreux aspects concernant l'importance des DC dans la réponse immunitaire antitumorale restent encore inconnus. La présence des DC permet-elle de limiter l'émergence de tumeurs ? Quelles sont les fonctions critiques des DC qui permettent une meilleure activation des lymphocytes anti-tumoraux lors de l'émergence de tumeurs ? Sont-elles tout aussi importantes pour des tumeurs agressives mais traitées par immunothérapies ? Nos travaux sur les DC permettront de répondre à ces questions fondamentales et permettront de mieux maîtriser les fonctions thérapeutiques des DC chez des patients atteints de cancers. Le projet développé ici s'articulera donc autour de plusieurs objectifs :

- 1- Décrire la biologie des DC dans l'environnement tumoral en cas de rejet naturel de la tumeur
- 2- Décrire la biologie des DC dans l'environnement tumoral au cours d'une immunothérapie de type « Blocage des récepteurs inhibiteurs »
- 3- Décrire la biologie des DC dans l'environnement tumoral au cours d'une immunothérapie basée sur le transfert adoptif de lymphocytes anti-tumoraux pré-activés.
- 4- Booster les DC pour améliorer les immunothérapies actuellement appliquées en clinique.

Nous étudierons la qualité de la réponse immunitaire antitumorale suite à la greffe de tumeurs (mélanomes, thymomes, et cancer du côlon ou cancer mammaire) ou lors d'un cancer induit chimiquement sur des souris génétiquement modifiées, dans lesquelles les DC sont absentes, ou une de leurs fonctions est altérée.

Dans ce projet, la règle des 3R sera respectée :

Remplacement :

Ce projet vise à étudier les DC dans la tumeur, dans le microenvironnement tumoral (c'est-à-dire les tissus porteurs de la tumeur et modifiés par la tumeur pour lui permettre de meilleures conditions de croissance), et dans les ganglions drainant la tumeur, lorsqu'une tumeur apparaît ou lorsqu'une tumeur est traitée par des immunothérapies. Aucune étude préalable *in vitro* n'est réalisable car il nous est impossible de recréer *in vitro* tous les facteurs physiologiques et environnementaux nécessaires à la reconstitution d'un modèle tumoral tel que défini *in vivo* (irrigué par le sang, drainé par la lymphe et modifiant les tissus environnementaux, donc l'infiltrat des cellules immunitaires). Ainsi l'intégration d'un système vivant et complet est indispensable. La taille, la rapidité du cycle de reproduction et la génétique de la souris en font le modèle le mieux approprié pour les études

envisagées pour lesquelles des animaux génétiquement modifiés sont nécessaires. La physiopathologie de la souris est suffisamment proche de celle de l'homme pour que son étude nous permette d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme. Ainsi le modèle murin est un modèle animal incontournable pour notre étude.

Réduction :

Nous utiliserons 5046 animaux pour mener à bien cette étude qui se déroulera sur 5 ans. Tous ces animaux, indépendamment mâles et femelles seront tous utilisés. Ainsi, chaque expérience sera répétée indépendamment deux fois, avec 8 animaux par groupe, minimum requis pour s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats.

Raffinement :

Pour limiter le stress des animaux, les souris seront élevées dans des animaleries conventionnelles et de niveau 3 exemptes d'organisme pathogène spécifique (EOPS). Les animaux seront gardés en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Leur environnement sera enrichi : ils disposeront de matériel pour confectionner des nids et des dômes protecteurs.

Pour les animaux affaiblis, l'accès à la nourriture et à l'eau sera favorisé. Le suivi du développement des pathologies se fera par des mesures régulières de la croissance tumorale et une grille de score de la douleur sera scrupuleusement appliquée pour évaluer les signes de souffrance, de stress et d'angoisse relatifs à l'expérimentation en cours.

14308 L'allergie alimentaire constitue un problème majeur de santé publique du fait de sa prévalence (jusqu'à 10% dans les pays industrialisés) et de la gravité des symptômes (anaphylaxies) qu'elle engendre. Les mécanismes immunitaires conduisant à la sensibilisation et à l'allergie sont encore mal connus bien qu'il semble que la peau pourrait être une voie de sensibilisation. Cependant, la voie cutanée est également impliquée dans l'induction de tolérance, plus particulièrement au cours de la désensibilisation épicutanée, traitement qui a montré des résultats prometteurs en phase III clinique chez les patients allergiques à l'arachide.

Dans ce contexte, ce projet vise à étudier les mécanismes immunitaires au niveau de la peau et des organes immunitaires associés (ganglions, rate) impliqués dans ces phénomènes de sensibilisation et/ou de désensibilisation afin de les comprendre et de pouvoir intervenir dessus.

Pour ce faire, des souris naïves ou rendues allergiques par injection d'un allergène, seront désensibilisées par application répétée du même allergène à faible dose par voie épicutanée pendant 8 semaines. A différents temps au cours du traitement, la réponse immunitaire et le suivi de cellules immunitaires cutanées seront analysés (phénotype, dynamique, fonction). Ces travaux permettront de mettre en évidence des biomarqueurs de la désensibilisation et des potentiels cibles afin d'améliorer l'efficacité du traitement.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). Premièrement, le nombre de souris utilisé est minimisé et optimisé pour préserver la robustesse des analyses statistiques. Il est envisagé d'utiliser 1284 souris. Les protocoles sont planifiés de telle sorte que toutes les analyses sont réalisées sur le même animal (i. e. analyses de la réponse immunitaire dans la peau et les organes immunitaires). Deuxièmement, le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu. De plus, une anesthésie est mise en place dès que nécessaire pour limiter la souffrance des animaux, et des points limites suffisamment prédictifs sont établis pour chaque expérimentation afin d'éviter toute souffrance des animaux. Enfin, aucun test *in vitro* (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie.

14309 Notre laboratoire développe un traitement pour la maladie de Crigler-Najjar (CN). Il s'agit d'une maladie héréditaire très rare qui atteint les cellules du foie. En France, elle concerne moins d'une naissance sur un million. Elle se manifeste par une jaunisse très sévère, qui peut devenir mortelle si elle n'est pas très vite traitée. A l'origine de cette pathologie, une mutation de l'ADN entraîne la

défaillance d'une enzyme synthétisée par le foie (UGT1A1) qui est normalement chargée d'éliminer de l'organisme la bilirubine, un composé extrêmement toxique. Chez les malades, ce déficit en UGT1A1 entraîne une accumulation de bilirubine dans tous les tissus, et en particulier dans le cerveau, provoquant de graves dommages neurologiques. Les patients les plus sévèrement touchés meurent généralement pendant l'enfance suite à ces atteintes cérébrales. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif.

On connaît depuis 1938 un modèle animal naturel d'accumulation de bilirubine, le rat Gunn. Les lésions génétiques de ce rat sont similaires aux malades CN.

Grace à ce modèle animal, nous avons pu élaborer un traitement de thérapie génique qui permet d'apporter aux cellules du foie une nouvelle copie d'ADN, compensant le défaut génétique, afin que soit rétablie l'activité de l'enzyme UGT1A1, permettant ainsi l'élimination du composé toxique. Ce traitement a prouvé son efficacité et son innocuité chez l'animal.

La principale limite à cette approche est le déclenchement d'une réaction immunitaire dirigée contre le produit de thérapie génique, réduisant à terme son efficacité. Pour tenter de contourner ce problème, nous allons tester une combinaison de traitements anti-inflammatoires et immunosuppresseurs à notre produit de thérapie génique.

La complexité du système immunitaire et de ses mécanismes de régulation font qu'il n'existe pas aujourd'hui de méthodes alternatives au modèle animal pour répondre à ces problématiques. Aussi, cette étude sera menée chez le rat GUNN, modèle de la pathologie. Le projet d'une durée de 5 ans est composé de 3 procédures.

A travers ces procédures, classées de sévérité légère, nous réduirons au minimum l'impact des protocoles sur le bien-être des animaux, afin de ne provoquer ni stress, ni angoisse, ni douleur. Notamment, les rats seront habitués au préalable à la manipulation et à la contention pour diminuer leur stress lors des injections des traitements (immunosuppresseurs et produit de thérapie génique). Les prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie. Un suivi vigilant de l'état général des 230 animaux de l'étude sera mis en place. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles et en fonction d'une analyse statistique afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

14310 Effets de la modulation du taux d'un composé sanguin, l'hème, sur les premières étapes de colonisation bactérienne du tractus digestif

L'hème, principal composant de l'hémoglobine, est la structure chimique qui porte le noyau de fer permettant le transport de l'oxygène dans le sang. Cette molécule est également essentielle dans de nombreux processus cellulaires et sert de cofacteur pour un certain nombre de protéines. Malgré son rôle essentiel, l'hème est aussi connu pour avoir un effet toxique sur les cellules.

Dans le tractus digestif, l'hème en faibles quantités fait partie des métabolites naturellement présents mais l'augmentation de la quantité d'hème dans l'intestin est généralement un signe précoce d'une pathologie intestinale. Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques par exemple, on observe l'apparition plus ou moins importante de saignements. Ce sang libère dans le tractus digestif de l'hème qui va alors amplifier, par son effet cytotoxique, la réaction inflammatoire de l'épithélium intestinal. Malgré tout, cette présence d'hème est également nécessaire à l'implantation de certains des microorganismes du tractus digestif.

Lors de la primo-colonisation de l'intestin, les différentes espèces bactériennes s'installent suivant un certain ordre, défini par les conditions régnant au sein du tractus digestif. Cette cinétique d'implantation va jouer sur l'obtention de l'équilibre final du microbiote intestinal. Certaines espèces bactériennes naturellement présentes en grande quantité, comme *Bacteroides thetaiotaomicron*, ont un besoin fort en hème pour croître normalement. S'il existe des différences dans la quantité d'hème disponible dans le tractus digestif, les espèces sensibles à l'hème s'installeront de manière différente selon les individus.

Le but de notre étude est de voir si en modulant la quantité d'hème présente dans le tractus digestif, nous pouvons modifier les capacités d'implantation de *Bacteroides*.

Pour cela, nous allons implanter, par gavage, dans le tractus digestif de souris dépourvues de microbiote (axéniques), une souche d'*Escherichia coli*, exprimant un hémophore, molécule capable de capter l'hème. Nous allons ensuite faire un second gavage avec une quantité faible de *Bacteroides thetaiotaomicron* et suivre l'implantation de cette bactérie dans le tractus digestif de la souris par dénombrement dans les fèces.

Ces expériences mettent en œuvre des techniques non invasives d'étude chez la souris, les gestes techniques se limiteront à deux gavages orogastriques et à des prélèvements de fèces effectués lors de la défécation naturelle.

L'utilisation de souris de laboratoire ne peut pas être évitée, car nous mettons en évidence une interaction entre l'hôte et la bactérie, et il n'existe pas de méthode alternative à l'étude d'une telle interaction.

Pour cette étude nous avons besoin de 3 lots de 6 souris Balb/c mâles (1 lot témoin avec notre bactérie d'intérêt *B. thetaiotaomicron*, 1 lot avec 1 bactérie capable de capter l'hème (*E. coli*) et *B. thetaiotaomicron* et 1 lot avec la même espèce bactérienne (*E. coli*) qui ne capte pas l'hème et *B. thetaiotaomicron*). L'expérience sera renouvelée 3 fois ce qui est un minimum pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. De plus pour prendre en compte le risque de contamination accidentelle, risque inhérent à ce type d'expérience sur animaux axéniques, nous prévoyons 6 souris mâles supplémentaires pour recommencer un lot si nécessaire ce qui portera le nombre total d'animaux à 60.

Les gavages à la sonde souple sont effectués par du personnel expérimenté. Les animaux sont surveillés après gavage afin de s'assurer de l'absence de problème. Au cas où un incident survenait durant le gavage, blessure des voies digestives et/ou aériennes supérieures par exemple, l'animal blessé est sorti de l'expérimentation et euthanasié.

Pour limiter au maximum le stress, les souris, animaux sociables, sont hébergés en groupe et leur milieu de vie est enrichi en objets susceptibles d'être rongés ou déchiquetés et pouvant servir à la construction de nids (papiers, cartons, etc.).

14311 Les mammites sont des infections bactériennes de la mamelle chez les ruminants et sont un problème majeur de la filière laitière à cause d'une altération de la qualité du lait et d'une augmentation des coûts de production. Cette pathologie peut toucher entre 5 et 10 % des animaux d'un élevage. Ces infections entraînent une utilisation importante d'antibiotiques avec des résultats faibles et aboutissent souvent à la mort ou à une réforme prématurée des animaux contaminés. En complément des mesures d'hygiène comme le soin apporté au moment de la traite ou l'état sanitaire du paillage dans les étables, il est prévu de recourir à une sélection génétique pour augmenter l'immunité vis-à-vis des infections mammaires et la résistance globale aux mammites. Cependant, les principaux gènes et mécanismes qui contrôlent la prédisposition aux mammites ne sont pas connus.

Une mutation ponctuelle dans le gène SOCS-2 a été identifiée chez des brebis de race Lacaune comme étant fortement liée à l'apparition de mammites mais aussi à une augmentation de la taille et de la production laitière et ces avantages expliquent pourquoi cette mutation a été largement sélectionnée dans les élevages. Les effets de cette mutation montrent que SOCS2 pourrait donc agir à la fois sur une augmentation de la production laitière, sur la croissance mais aussi sur l'immunité et sur la prédisposition négative aux infections bactériennes.

Etant donné la complexité physiologique de la glande mammaire, il n'existe actuellement pas de modèle cellulaire *in vitro* de cet organe. De ce fait, l'objectif du projet est d'étudier les mécanismes de prédisposition aux infections bactériennes en présence de la mutation trouvée dans le gène SOCS-2 en dehors de toute autre variation génétique chez des animaux mis à la reproduction. Pour cela, nous avons choisi de modifier de manière ciblée le gène SOCS2 d'animaux résistants aux mammites et de déterminer ainsi si la mutation identifiée peut expliquer à elle seule la sensibilité aux mammites.

Le projet débouchera sur de nouvelles connaissances applicables en sélection génétique pour l'amélioration de la santé des animaux, mais aussi de nouvelles connaissances sur les mécanismes

de régulation des réponses immunes et inflammatoires. A l'échelle d'un troupeau de brebis, une description précise de l'apparition de mammites en relation avec le gène SOCS-2 muté sera réalisée ainsi qu'une évaluation de la production laitière. Les effets bénéfiques ou négatifs de cette mutation sur les objectifs de production laitière seront analysés, et une stratégie pour la gestion future de la mutation dans la population de brebis de race Lacaune sera mise en place.

Nous désirons obtenir 5 à 6 agnelles porteuses de la mutation dans le gène SOCS2 afin de comparer l'apparition de mammites éventuelles chez ces animaux par rapport à des animaux naturellement sensibles aux mammites après mise à la reproduction et pendant la lactation. Ce nombre d'animaux a été choisi afin de réduire le temps nécessaire à l'obtention de données statistiques si toutes les brebis ne sont pas gestantes en même temps.

Nous utiliserons pour ce projet 30 brebis de race Lacaune résistantes aux mammites sur lesquelles seront pratiquées des ponctions ovariennes par endoscopie et sous anesthésie générale afin d'obtenir des embryons par fécondation *in vitro*. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés pour ce protocole, nous doserons l'hormone AMH dans le sang des brebis donneuses afin de ne sélectionner que quinze brebis avec un fort potentiel à la production d'ovocytes. Après modification génétique, le transfert de deux ou trois embryons porteurs de la mutation d'intérêt du gène SOCS2 sera effectué dans des brebis de race Romane. La race Romane a été sélectionnée car elle permet d'avoir des gestations multiples jusqu'à 3 ou 4 petits par portée. Cette race de brebis nous permettra ainsi de réduire le nombre de femelles receveuses nécessaires au projet pour atteindre notre objectif de 5 à 6 animaux porteurs de la mutation d'intérêt. Nous envisageons d'avoir besoin de 30 brebis de race romane pour ce projet. En effet, la manipulation préalable d'embryons *in vitro* diminue la probabilité d'obtenir une gestation à terme et un rendement de 10 à 20% d'embryons transférés donnant un petit à la naissance est une base statistique courante.

Notre projet nécessite donc l'utilisation de 60 animaux répartis en 2 groupes de 30 donneuses et 30 receveuses d'embryons. Les animaux de race Lacaune et de race Romane sélectionnés proviennent d'élevages de brebis utilisées pour la recherche. Ils seront hébergés par groupe de 6 animaux afin de respecter leurs besoins d'animal grégaire.

Tous les animaux seront élevés dans des bâtiments neufs agréés et suivis par des personnels qualifiés, dont un vétérinaire, à même de détecter toute anomalie comportementale ou symptomatique des animaux. Ces personnels pourront apporter immédiatement les soins nécessaires pour le maintien d'une qualité de vie optimale et réduire toute apparition de gêne ou de détresse chez un animal. Ce suivi sera particulièrement important lors des phases de récupération après les ponctions ovariennes ou les transferts d'embryons.

En fin de projet, les donneuses d'ovocytes pourront être placées, après un contrôle vétérinaire, par une association de protection animale qui gère la réhabilitation des animaux de laboratoire.

14312 La douleur aiguë est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation tissulaire (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires invalidants. D'où la nécessité de découvrir de nouveaux médicaments et pour ce faire de disséquer les mécanismes responsables d'une douleur chronique.

Or, si notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur s'est récemment fortement accrue, aucune avancée thérapeutique majeure n'en a résulté. Une des raisons à cela est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. Qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes: douleurs spontanées et douleurs provoquées, par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Il est maintenant clair que ces symptômes dépendent de mécanismes distincts et réclament donc des traitements spécifiques.

L'allodynie mécanique est le symptôme le plus fréquemment rencontré chez les patients douloureux chroniques: chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. De

plus l'apparition d'une allodynie est un facteur de risque de chronicisation de la migraine. D'où l'intérêt de concevoir un traitement spécifique de ce symptôme. On sait maintenant que l'allodynie mécanique est associée à l'activation, dans la corne dorsale (CD) de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du trijumeau (Sp5C), de circuits neuronaux allant des couches profondes, où aboutissent les informations tactiles, vers les couches superficielles, d'où partent les voies de la douleur vers le cerveau. Ces circuits sont inactifs en conditions physiologiques, et les informations tactiles et douloureuses restent bien séparées. Cependant en conditions inflammatoires ou neuropathiques, les circuits allodyniques se démasquent et les informations tactiles peuvent alors gagner les voies de la douleur dans les couches superficielles de CD/Sp5C. Le cerveau recevant une information tactile par l'intermédiaire des neurones de la douleur, l'interprète donc comme une douleur.

Plusieurs évènements cellulaires contribuent au démasquage des circuits allodyniques, notamment l'activation de protéines kinases (PK) telles que l'extracellular signal-regulated protein kinases (ERK), l'isoforme γ de la protein kinase C (PKC γ) et la p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). Inhiber les PKs pourrait constituer un traitement de l'allodynie mécanique.

Avec un Institut de Chimie, nous avons récemment synthétisé une série d'inhibiteurs de la p38 MAPK présentant une activité anti-allodynique, à la fois puissante et prolongée, dans un modèle de douleur inflammatoire persistante de la face chez le rat [injection intradermique d'adjuvant complet de Freund (CFA)]. Il s'agit maintenant d'évaluer l'effet de substitutions sur une molécule originale sur son activité anti-allodynique.

En vue de l'application de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés pour ce projet a été réduit au maximum. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements (analyse de variance et tests paramétriques ou non paramétrique). Au total 360 rats seront utilisés. Ils seront mis à mort après la fin des procédures par overdose de pentobarbital. Le but de ce projet est de découvrir de nouveaux médicaments antalgiques, inhibiteurs de la kinase p-38. L'activité inhibitrice et la spécificité anti p-38 de cette nouvelle série de molécules synthétisées ont d'abord été améliorées à l'aide de modélisations *in silico* et de tests biochimiques sur l'activité kinase. Il s'agit maintenant de vérifier directement chez l'animal, l'activité anti-allodynique des meilleurs de ces candidats-médicaments. Il ne peut y avoir ici de mesure de remplacement, le comportement douloureux étant un phénomène complexe mettant en jeu l'activité synchrone d'un grand nombre de régions du cerveau.

Toutes les injections – sous-cutanées ou intracisternales – seront faites sous anesthésie. Cependant, il n'est pas possible de réduire la douleur infligée par l'injection intradermique de CFA puisqu'il s'agit justement du comportement à mesurer. Par contre tout sera fait pour réduire au maximum l'anxiété provoquée chez ces animaux par le nouvel environnement – animaux hébergés dans des cages à environnement enrichi dans notre animalerie pendant une semaine avant toute manipulation et soumis à des séances d'habituation pendant 4 jours avant le test.

14313 Les mammites sont parmi les maladies les plus fréquentes en élevage laitier et sont le poste le plus important d'utilisation d'antibiotiques. Malgré les mesures d'hygiène lors de la traite, telles que l'utilisation de solution de post-trempage, l'incidence des mammites reste forte. Les traitements curatifs reposent essentiellement sur l'antibiothérapie, qui ne s'avère pas toujours efficace et contribue au risque de dissémination de l'antibiorésistance. L'élevage doit faire face à cette menace latente et faire évoluer les pratiques vers des approches plus durables, respectueuses de l'environnement et de l'animal. Le concept de contrôle biologique apparaît comme une alternative à explorer. L'utilisation de bactéries lactiques (BL) comme flore de barrière a donné des résultats encourageants dans divers contextes (digestif, vaginal, peau), permettant d'améliorer la santé humaine et animale. Des travaux ont montré, *in vitro*, l'effet barrière de BL isolées du lait bovin contre les pathogènes responsables de mammite.

Le projet vise à évaluer, *in vivo*, l'impact de l'application d'un probiotique sur les trayons, en fin de traite, sur la santé de la mamelle et sa fonctionnalité. Contrairement aux rares essais déjà menés *in vivo*, qui ont évalué l'impact d'une injection intra-mammaire, nous procéderons à une application

locale du probiotique sur le trayon, par pulvérisation, dans l'optique d'une application préventive non invasive. Le projet à ce stade vise à démontrer une preuve de concept.

Nous faisons l'hypothèse qu'une administration externe sur le trayon du probiotique aura des effets sur la flore de la peau du trayon et donc également, en conséquence, sur la flore interne du trayon et la présence de pathogènes dans ces deux sites anatomiques. Nous postulons que le probiotique aura un effet barrière vis-à-vis des pathogènes par compétition et inhibition directe tout en préservant, dans une certaine mesure, la diversité bactérienne naturelle associée au trayon. Maintenir une flore microbienne protectrice et compétitrice au niveau du trayon pourrait s'avérer plus efficace pour réduire la présence de pathogènes sur le trayon et limiter leur entrée dans la mamelle qu'une désinfection systématique, qui, si elle est imparfaite, peut s'avérer plus permissive aux pathogènes. Outre l'impact sur la flore microbienne du trayon, nous évaluerons l'impact sur la réponse inflammatoire locale, la production et la qualité du lait et plus largement la fonctionnalité et l'intégrité de l'épithélium mammaire. Un essai sera conduit sur 30 vaches laitières (24 dans l'essai et 6 en pré-essai) en milieu de lactation. Les animaux seront répartis en 3 lots : Le 1er lot ne recevra aucun traitement post-traite. Un lot sera traité par trempage post-traite des trayons dans une solution d'iode, le 3e lot recevra la solution probiotique, en remplacement du trempage à l'iode.

Ce projet constitue, à notre connaissance, la première étude scientifique *in vivo* sur ces approches probiotiques explorant une application locale externe, pouvant constituer une approche de prophylaxie simple à mettre en œuvre pour prévenir les mammites, et donc réduire l'usage des antibiotiques. La stratégie proposée, si elle se révèle pertinente, présente l'intérêt de limiter l'utilisation de produits de désinfection et la présence de résidus dans le lait ou l'environnement dans une logique de durabilité. Nous intégrons l'impact sur le lait et sa qualité, afin de ne pas négliger les conséquences sur les processus aval de transformation.

Cette étude constituera une preuve de concept de l'intérêt d'une telle approche avant d'envisager une expérimentation à plus grande échelle, afin d'évaluer l'efficacité de cette approche dans des modèles de conduite de troupeaux différents.

Nous veillerons au respect de la règle des 3R : réduire, raffiner, remplacer.

Remplacement : il n'est pas possible de réaliser cette étude autrement que sur vaches en lactation.

Réduction : le nombre d'animaux a été calculé en fonction du traitement statistique choisi et adapté au schéma expérimental. Nous avons privilégié les prélèvements sur le lait (méthode non invasive d'étude des cellules mammaires)

Raffinement : la conduite d'élevage sera une conduite classique respectueuse du bien-être des animaux. Chaque procédure de prélèvement d'échantillons biologiques sera accompagnée par une procédure adaptée et un suivi des animaux. La méthode choisie pour étudier le fonctionnement de la glande mammaire est une méthode non invasive.

14314 Les astrocytes sont les cellules gliales majoritaires du cerveau. Ils possèdent une interface vasculaire qui consiste en des prolongements ou "pieds" qui vont au contact des vaisseaux sanguins cérébraux. A cette interface, les astrocytes régulent les fonctions vasculaires cérébrales. Ils maintiennent en particulier l'intégrité des vaisseaux sanguins cérébraux et le dialogue immunitaire entre le sang et le cerveau. Ils sont donc cruciaux pour le fonctionnement du cerveau. Cependant les modalités de ces régulations astrocytaires sont très mal connues alors même qu'elles sont altérées dans un grand nombre de pathologie cérébrales. L'intérêt d'étudier les interactions entre les astrocytes et le système vasculaire est donc in fine de pouvoir comprendre les mécanismes de ces pathologies et de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques

Notre projet a pour but d'étudier les interactions astrocytes-vaisseaux sanguins et leur rôle dans le contexte pathologique de l'inflammation pendant laquelle les cellules immunitaires du sang pénètrent dans le cerveau de façon anormale. Nous avons choisi de cibler notre étude sur MLC1 une molécule des astrocytes très enrichie dans les pieds astrocytaires périvasculaires. Le rôle de MLC1 dans le contexte physiologique des régulations astrocytaires périvasculaires n'est pas connu.

Pour comprendre le rôle de cette molécule à l'interface gliovasculaire, nous souhaitons caractériser les vaisseaux sanguins et les astrocytes en l'absence de MLC1, dans un contexte normal et

inflammatoire induit. A ce jour, de nombreuses études ont été mené *in vitro* sur MLC1. Elles n'ont cependant pas permis de comprendre le rôle de MLC1 dans le contexte de l'unité gliovasculaire. Ce projet repose donc sur l'utilisation d'un modèle murin dans lequel le gène MLC1 est inactivé ainsi que sur la lignée BacTrap qui permet de purifier les ARN astrocytaires. Le phénotype de ces deux lignées de souris ne présente pas de caractère dommageable. Grâce à ces modèles, nous souhaitons caractériser l'unité gliovasculaire (l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins) dans un contexte normal et inflammatoire, en réalisant des caractérisations moléculaires (études transcriptomiques et biochimiques) et histologiques.

Nos expérimentations seront menées sur la souris qui représente un très bon modèle d'étude du cerveau des mammifères. Le modèle murin est irremplaçable pour notre étude car il n'existe en effet pas de système *in vitro* reproduisant la structure complexe de l'unité gliovasculaire. Notre projet repose sur des protocoles de purification de l'unité gliovasculaire et des observations histologiques réalisés à partir des cerveaux disséqués après euthanasie des animaux ces protocoles ont mis au point au laboratoire et adaptés aux études transcriptomiques, biochimiques et d'histologie. Le protocole d'induction de l'inflammation systémique par injection intrapéritoneale de protéines bactériennes ou LPS à une dose minimale est également très bien documenté dans la littérature. Ces protocoles ont tous optimisés et raffinés permettant de réduire à son minimum le nombre d'animaux à utiliser. De plus, nous réduirons au maximum les techniques douloureuses par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques et en réduisant le temps d'inflammation avant l'euthanasie. Nous veillerons au bien être des animaux, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation.

Le nombre total d'animaux inclus dans ce projet est de 1649 et la durée du projet est de 5 ans.

Ce projet permettra de comprendre le rôle de MLC1 à l'interface gliovasculaire, et plus généralement de comprendre le rôle des astrocytes dans le contrôle des fonctions vasculaires cérébrales qui sont en jeu dans un grand nombre de pathologie cérébrales.

14315 Nos recherches abordent les réseaux et les mécanismes neuronaux de la mémoire avec un intérêt particulier pour la mémoire épisodique ou souvenir, c'est-à-dire la mémoire par laquelle on se souvient d'évènements vécus avec leur contexte. Les mécanismes cérébraux qui sous-tendent cette forme de mémoire sont encore largement méconnus et pour les appréhender chez l'animal de laboratoire il est nécessaire de développer des dispositifs expérimentaux originaux et adaptés. Nous disposons par exemple d'une enceinte comportementale permettant à des rats de former de nouveaux souvenirs associant une place, une odeur et une boisson dans différents contextes. Ce même dispositif est utilisé pour déterminer ce dont les rats se souviennent lors de tests de rappel à court ou long terme et en identifier les corrélats neuronaux. Pour réaliser ce type de tâche mnésique les rats sont motivés au moyen d'une restriction d'accès à l'eau de boisson ; dans d'autres tâches comportementales la restriction peut porter sur l'accès à la nourriture. Dans l'un et l'autre cas ces restrictions d'accès sont implémentées progressivement sur une semaine et n'entraînent pas de dommage majeur pour la santé et le bien-être : les animaux ont toujours accès à une ration d'eau ou d'aliment couvrant leur besoins quotidiens mais sur des périodes de temps réduites. Cette approche peu contraignante permet de maintenir la motivation des animaux tout au long d'une étude qui se déroule sur plusieurs semaines.

Dans le présent projet nous souhaitons vérifier les fonctionnalités d'un nouveau dispositif destiné à superviser le bien-être des animaux en hébergement et en conditions réelles d'expériences. Ce dispositif se présente sous la forme d'un support de cage équipé de capteurs permettant de suivre la consommation individuelle d'eau et de nourriture et ainsi de vérifier que les animaux tolèrent bien les restrictions d'accès au cours des expériences. Des systèmes électroniques de détection sont positionnés près des sources d'aliment et d'eau pour mesurer précisément les quantités délivrées. Chaque animal étant équipé d'une puce d'identification RFID, similaire à celle utilisée pour les animaux de compagnie, il est ainsi possible de suivre la consommation individuelle de chaque animal. Le dispositif est également équipé de capteurs de température et d'hygrométrie pour la surveillance des conditions environnementales, d'une caméra vidéo pour le suivi à distance du comportement et de l'état général des animaux.

Nous avons d'ores et déjà pu vérifier la fonctionnalité d'un premier prototype sans utiliser d'animaux en réalisant des tests techniques à l'aide de sondes de mesures et de « fantômes d'animaux ». Nous avons notamment vérifié que le dispositif détecte et délivre le numéro unique de chaque puce RFID, ainsi que la délivrance d'eau à chaque coup de langue détecté. Nous souhaitons à présent vérifier avec des animaux la fonctionnalité de ce dispositif, qui sera ensuite étendu pour le monitoring simultané de huit cages en parallèle, avec pour objectif de l'implémenter dans nos futures expériences. Les rats seront implantés avec une puce de dernière génération biocompatible. Pour assurer le confort de l'animal pendant la pose de ce transpondeur, nous aurons recours à une brève anesthésie gazeuse. Les rats seront placés en groupes dans une cage standard, avec enrichissement, biberon d'eau et nourriture ad libitum, conformément aux conditions d'hébergement en vigueur dans notre animalerie. Aux fins de tests, d'une durée maximale d'une à deux heures, la cage sera sortie du box d'hébergement et transportée sur un chariot jusqu'à la pièce expérimentale dans laquelle se dérouleront les tests. La cage sera simplement déposée et glissée sur son support équipé de capteurs et circuits de détections. A l'aide d'une caméra positionnée sous la pipette, nous pourrons visualiser les coups de langue sur la pipette d'abreuvement et vérifier la correspondance avec les impulsions détectées électroniquement. Afin d'encourager les animaux à venir s'abreuver, de l'eau légèrement sucrée sera mise à disposition au cours des tests. Pour vérifier la fonctionnalité du dispositif en conditions d'expériences, des restrictions d'accès à l'eau seront mises en place dans les conditions déjà validées et sans dommage pour les animaux. A l'issue du test, la cage sera replacée dans le box d'hébergement.

Les résultats attendus concernent la fonctionnalité du dispositif qui pourra ensuite être implémenté dans nos projets de recherche. Ce dispositif devrait améliorer sensiblement le suivi du bien-être animal en hébergement et dans nos protocoles expérimentaux ainsi qu'un raffinement des conditions d'études de la mémoire.

Ce projet de recherche fondamentale, planifié sur trois ans, s'appuie sur l'utilisation d'un nombre total d'animaux estimé à 30 rats. Ce nombre est une estimation haute basée sur notre expérience des études comportementales chez le rongeur. Il tient compte d'un effectif minimal pour obtenir des groupes d'animaux présentant des profils comportementaux comparables, et d'un âge maximal de 18 mois au-delà duquel ils ne sont plus utilisés pour des études comportementales. Les animaux proviendront autant que possible d'élevages en cours dans notre animalerie.

Le bien-être animal est une condition essentielle à la réalisation de ce projet et les mesures prises pour y veiller comprendront une surveillance des animaux de façon à détecter au plus tôt la survenue éventuelle de signes d'inconfort, de stress ou de douleur à toutes les étapes du projet et une surveillance des conditions d'hébergement. Dans la mesure du possible, nous réaliserons des expériences complémentaires sur les mêmes animaux de façon à limiter le nombre total d'animaux utilisés. La gravité des procédures étant légère, les animaux ne seront pas mis à mort en fin de projet et pourront être réutilisés dans d'autres procédures après avis vétérinaire.

14316 Les changements prévus par le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) en 2014 pour le XXI^e siècle indiquent que l'océan continuera de se réchauffer et de s'acidifier. En particulier pour les eaux tempérées de l'Atlantique Nord, les changements dans les températures moyennes à la surface de la mer devraient passer de +1°C pour le scénario le plus optimiste à +4°C pour le plus pessimiste.

La façon dont les communautés marines réagiront à ces variations demeure incertaine, mais dépendra de l'écologie et de la physiologie propres à chaque espèce. Les poissons, en particulier, ont évolué physiologiquement pour pouvoir vivre dans une plage spécifique de variation environnementale, et l'existence à l'extérieur de cette plage peut être stressante ou fatale à l'espèce. Ces recherches sur la physiologie et l'écologie des poissons sont nécessaires pour prédire comment les espèces réagiront aux perturbations et ainsi améliorer la gestion future des stocks de poissons. La mortalité au cours des premiers stades de vie est une cause majeure des variations naturelles de l'importance des populations de poissons marins, ce qui rend crucial la compréhension

des effets des changements climatiques sur les premiers stades de la vie des poissons pour anticiper le devenir des stocks de pêche.

Le hareng de l'Atlantique (*Clupea harengus*) est largement répandu dans tout l'océan Atlantique Nord et, en plus d'être une espèce importante sur le plan commercial, il représente également une importante source de nourriture pour un certain nombre d'autres espèces.

L'objectif de ce projet sera d'étudier les réponses des larves de hareng aux changements globaux (paramètres multiples et variables) ce qui permettra d'anticiper le devenir de cette espèce face au changement climatique en adaptant la gestion halieutique des stocks ; ce projet n'induirait aucun dommage au milieu naturel puisque les larves de harengs seront obtenues à partir de gonades de poissons frais prélevés dans les criées. Comme nous visons à réaliser une évaluation réaliste des impacts du changement global sur les larves de poissons nous testerons différents scénarios d'évolution des océans prévus pour 2100, qui intègrent la variation simultanée de plusieurs facteurs: acidification ($PCO_2 = 1200 \mu\text{Atm}/\text{pH}=7.6$), réchauffement ($+3^\circ\text{C}$), et une diminution de la qualité de la ressource alimentaire (baisse des quantités d'acides gras polyinsaturés de la série oméga 3). Nous expérimenterons sur 18000 larves afin d'étudier leurs capacités d'acclimatation en terme de développement et croissance. Il faut noter que ces conditions environnementales, en particulier l'acidification, sont déjà rencontrées ponctuellement par les larves de harengs dans certains secteurs de la Manche Orientale/Mer du Nord.

L'information issue de ce projet nous aidera à comprendre l'impact potentiel du changement global sur la condition physiologique des larves de poissons, leur survie et leur potentiel succès de recrutement. Ces résultats généreront les connaissances nécessaires pour gérer efficacement et exploiter durablement les systèmes côtiers.

Ce projet répond aux critères des 3R:

Remplacement: Dans le cadre d'une étude visant à comprendre les réponses de larves poissons à des changements environnementaux, il n'est pas possible de faire appel à des méthodes de remplacement. En effet, ces réponses sous-tendent différents processus développementaux et biologiques ce qui nécessite l'utilisation d'organismes vivants afin d'intégrer dans l'étude toutes les composantes physiologiques.

Réduction : le nombre de larves a été réduit au minimum et défini au seuil de la pertinence scientifique et statistique.

Raffinement : Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche).

14317 Les infarctus cérébraux, aussi connus sous le nom d'AVC pour accident vasculaire cérébraux, sont une cause majeure de handicap à long terme. Les séquelles peuvent être fonctionnelles (déficit moteur, trouble du langage...) mais aussi cognitives (troubles de mémoire, ralentissement psychique...) et psychologiques (dépression, anxiété). Il est bien établi que le volume de l'infarctus cérébral ne prédit qu'imparfaitement les séquelles. Une étude en imagerie par résonance magnétique (IRM) que nous avons récemment réalisée sur plus de 400 patients victimes d'un infarctus cérébral indiquent que du fer s'accumule dans des régions, initialement épargnées par l'infarctus, comme le thalamus. Nos données suggèrent fortement que l'excès de fer dans ces régions, finalement déconnectées, impacte significativement l'évolution clinique à long terme et indépendamment des autres facteurs pronostiques.

Ainsi, nous faisons l'hypothèse, qu'à terme, éviter l'accumulation de fer par des traitements (chélateur du fer) en post-infarctus cérébral pourrait protéger les régions déconnectées par l'infarctus et ainsi avoir un impact neuroprotecteur.

Avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme, il convient de prouver chez l'animal que du fer s'accumule progressivement dans les régions déconnectées par l'infarctus et que celui-ci

induit des dommages cellulaires. Ce projet est une étude pilote visant à valider notre hypothèse et quantifier le fer et les dommages cellulaires induits sur un modèle murin d'infarctus très peu invasif. Pour réaliser cette étude pilote, 72 souris C57BL/6J seront utilisées afin d'induire un AVC de taille limitée dans le cortex et d'étudier les dommages à distance et leur lien avec l'accumulation de fer à distance. L'AVC sera induit par la méthode photo-thrombose chez la souris qui est actuellement la méthode la moins invasive pour reproduire la pathologie humaine. Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* et donc de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 72 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour une période de 18 mois. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Ce total de 72 animaux se répartit comme suit. Nous analyserons l'accumulation de fer et les dommages cellulaires au cours de 6 points temporels après l'induction du modèle d'AVC (1, 2, 3, 4, 5 et 7 semaines ; n=3 animaux par point temporel avec modèle AVC et n=3 animaux contrôle : total n=36). Nous analyserons aussi les modifications de l'activité électrique des neurones aux mêmes points temporels ce qui nécessite de collecter d'autres groupes expérimentaux car la préparation des tissus est différente (total n=36). Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux : anesthésiques, anesthésies, tapis chauffant et gel oculaire seront utilisés.

14318 Le projet a pour objectif de mettre en place dans notre laboratoire le « test de toxicité aux premiers stades de la vie » sur poissons, décrit dans la ligne directrice de l'OCDE n°210. Ce test fait partie d'un ensemble de tests d'écotoxicité imposé par certaines réglementations (REACH notamment), il n'est réalisé qu'à la demande des autorités compétentes.

Le test OCDE 210 est destiné à déterminer les effets létaux et sub-létaux des produits chimiques sur les stades de développement de l'espèce étudiée (ici le poisson zèbre) et consiste à exposer des poissons aux premiers stades de leur vie à une série de concentrations du produit chimique dissout dans l'eau, les effets étant comparés à un lot témoin non exposé. Pour chaque test, 480 œufs fécondés et obtenus à partir d'adultes géniteurs seront répartis dans des enceintes expérimentales correspondant à une concentration définie du produit chimique. L'exposition se poursuit jusqu'à ce que les organismes du lot témoin atteignent le stade de développement juvénile (soit environ 30 jours après la ponte).

Les paramètres suivants seront étudiés pendant toute la durée d'un test :

- développement des embryons
- dénombrement des éclosions, des organismes survivants, des œufs dits « moisissés »
- apparence et comportement anormal des larves et juvéniles

Une analyse statistique déterminera la concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses étudiées ainsi que la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la CEx (concentration qui affecte x% de la population testée).

A la fin du test, les organismes survivants seront pesés et mesurés individuellement puis seront euthanasiés par un bain léthal d'anesthésiant. Les adultes géniteurs utilisés pour la production des œufs ne seront jamais exposés au produit chimique. Cependant, si la distinction mâle/femelle n'est pas possible après la ponte, ils seront euthanasiés. Dans le cas contraire ils seront réemployés pour des tests ultérieurs.

En conséquence, chaque test réalisé concernera un maximum de 480 organismes, depuis l'état d'œuf fécondé à celui de juvénile.

Le projet est divisé en 3 phases distinctes:

1. développement/mise au point : la difficulté du test réside essentiellement dans la maîtrise de l'environnement pour obtenir en temps voulu un nombre important d'œufs fécondés et dans

l'observation du développement "normal" des embryons. Cette phase se limitera donc à vérifier la production d'œufs obtenus en appliquant les conseils de nos fournisseurs de Danio et à observer le développement des embryons obtenus. Au cours de cette étape aucun organisme (adultes géniteurs ou œufs) ne sera exposé à un produit chimique ; aucun embryon ne sera conservé au-delà de 48h après fécondation.

2. validation de la maîtrise du test : il nous sera nécessaire de vérifier l'ensemble de la procédure telle que décrite dans la ligne directrice de l'OCDE (production, tri et exposition des œufs au produit chimique, suivi des différents paramètres de toxicité etc...). Dans cet objectif, nous réaliserons des tests en conditions réelles sur une substance de référence pour laquelle les CSE/CME0 et CE50 sont connues. Un maximum de 960 organismes exposés est envisagé, aucun adulte géniteur.

3. la phase de test réglementaire consiste à la réalisation des tests qui nous seront demandés par les autorités compétentes. Nous envisageons de réaliser annuellement 3 tests sur une durée de 5 ans, soit un total de 7200 organismes exposés, aucun adulte géniteur.

Dans le cadre des 3 R, le nombre de géniteurs sera réduit autant que possible en réemployant ceux pour lesquels la distinction mâle/femme est évidente (ils doivent être maintenus séparés avant la ponte). Le laboratoire est en contact avec plusieurs éleveurs de l'espèce concernée, nous serons ainsi en mesure de disposer de toutes les informations nécessaires pour réduire le nombre de test de développement/mise au point et de validation de la maîtrise du test au strict nécessaire. Le nombre d'organismes employés lors des tests réglementaires est fixé par la ligne directrice et ne peut être réduit.

A ce jour les méthodes alternatives au test OCDE 210 ne sont pas validées par les autorités compétentes, le remplacement n'est pas envisageable.

Tous les animaux utilisés sur l'ensemble de ce projet seront maintenus dans des conditions de vie optimales propres à l'espèce. La qualité de l'eau sera suivie à minima une fois par semaine avec contrôle des paramètres suivants: pH, oxygène dissous, teneurs en ammonium, nitrates et nitrites. Le laboratoire possède déjà l'agrément pour la détention de l'espèce Danio rerio.

14319 L'acidification des océans n'est pas sans conséquence pour les espèces qui les peuplent. Des études ont montré notamment que la réduction de pH des eaux marines fragilisait les coquilles calcaires des escargots, des huitres ou encore des moules. L'effet de l'acidification des océans sur les poissons est beaucoup moins connu et des études sont donc nécessaires pour comprendre dans quelle mesure ils sont aussi impactés par ce phénomène. L'un des effets de l'acidification les plus marqués chez les poissons semble concerner les aspects neurologiques. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier le comportement des poissons de la génération F1 (= génération des enfants) afin de vérifier si les troubles décrits chez les poissons de la génération F0 (= génération des parents) sont encore observables à la génération suivante.

Deux groupes d'animaux seront comparés (n=100 poissons au total) :

- Des poissons "Contrôle", élevés au pH actuel : pH 8. 2
- Des poissons "Acidification", élevés au pH prévu dans 100 ans : pH 7. 6

Deux expériences sont envisagées pour étudier le comportement des poissons :

1) Une première expérience en groupe (n= 8 groupes de 4 poissons « Contrôle » et n= 8 groupes de 4 poissons « Acidification ») : les poissons seront placés par 4 dans un bac expérimental (dimension L 156cm X l 100cm X H 14cm) et seront filmés pendant 1h (enregistrement vidéo). L'interaction entre les poissons sera analysée (distance entre les individus durant la nage).

2) Une seconde expérience en individuel (n= 12 poissons « Contrôle » et n= 12 poissons « Acidification ») : 1 poisson sera placé dans le bac expérimental dans lequel se trouvera un miroir (= stimulus attractif n°1). Le poisson sera filmé pendant 30 minutes (enregistrement vidéo) afin d'analyser l'interaction du poisson avec son reflet. Un second stimulus attractif sera ensuite proposé au poisson (= stimulus attractif n°2) et son comportement sera filmé durant 30 minutes supplémentaires (enregistrement vidéo). Le partage du temps entre les deux stimuli attractifs sera analysé.

3) Pour déterminer la nature du stimulus attractif n°2, une expérience préliminaire sera réalisée : il sera proposé au poisson soit le refuge d'un abri (qui consistera en une plaque de couleur noire de L 20cm X l 10cm déposée sur le fond blanc du bac), soit des granulés (aliments habituels). Un enregistrement vidéo d'1h sera réalisé et le temps passé dans la zone « abri » pour les uns (n= 6 poissons « Contrôle ») et la zone « granulés » pour les autres (n= 6 poissons « Contrôle ») sera comparé. Le stimulus jugé le plus attractif des deux sera conservé pour l'expérience décrite dans le point 2.

Ce projet mené chez le poisson devrait apporter des résultats essentiels sur les effets de l'acidification des océans sur plusieurs générations. Les analyses de comportement ne devraient entraîner ni de douleur ni de souffrance sévère pour les animaux utilisés. Par ailleurs, il est à noter que le terme "acidification" employé ici est relatif puisque les valeurs testées de pH de l'eau de mer restent supérieures à 7 (pH basique). Par conséquent, aucun effet "corrosif" propre à l'acidité n'est à attendre ici.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R :

- les expériences envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Réduction : nous utiliserons un nombre d'animaux correspondant au minimum requis pour s'assurer de la robustesse de nos analyses statistiques. Si au cours du travail nous constatons que ce nombre peut être réduit (en cas de variabilité interindividuelle plus faible qu'attendu par exemple), nous ne manquerons pas de le faire.
- les expériences envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Raffinement : tout sera mis en œuvre pour limiter l'angoisse et la souffrance des animaux. Il sera essentiel de réduire autant que possible le stress afin que les animaux adoptent un comportement le plus naturel possible.
- L'économie du modèle animal ne pourra pas être faite (Remplacer) dans la mesure où les processus étudiés s'appliquent à l'organisme vivant, dans son intégrité et toute sa complexité.

14320 Le mélanome est un cancer de la peau qui est principalement lié à une surexposition aux rayons ultraviolets. Lorsqu'il est dépisté à un stade précoce, il peut être traité efficacement avec la chirurgie ou grâce à des traitements ciblés. Cependant, certains patients sont résistants à ces traitements et il est indispensable de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques.

Ce projet s'inscrit dans une démarche translationnelle entre le développement préclinique et le développement clinique pour une visée thérapeutique dans le contexte du mélanome. Il permettra de tester différentes molécules avec un potentiel thérapeutique démontré *in vitro*. Cette étude apportera une contribution à la biologie et à la médecine humaine. En effet, elle améliorera les connaissances dans la physiopathologie des mélanomes et permettra d'avoir des modèles expérimentaux plus proches de la réalité clinique afin de valider de nouvelles stratégies thérapeutiques pour pallier la résistance existant aujourd'hui avec certains traitements.

Pour mener à bien ce projet, nous allons mettre en place deux modèles expérimentaux murins se rapprochant le plus de la pathologie humaine. En raison de la disponibilité des biopsies de patients, nous devons mettre en place ces deux types de modèles expérimentaux pour réaliser nos tests d'efficacité thérapeutique.

Dans le premier modèle, des souris immunodéficientes (dépourvues de système immunitaire afin qu'il n'y ait pas de rejet de la greffe), vont recevoir par voie sous-cutanée (au niveau du flanc) l'injection d'une lignée cellulaire tumorale dérivée de patients atteints de mélanome. Puis ces souris recevront, par voie intra-péritonéale ou orale (gavage avec une sonde souple) les différents traitements seuls ou combinés les uns aux autres. Les traitements seront donnés 5 jours par semaine pendant 1 à 2 mois. L'injection des cellules tumorales et l'administration des traitements n'entraîneront pas de douleur et par conséquent ne nécessiteront pas d'anesthésie préalable des souris. L'efficacité des stratégies thérapeutiques utilisées sera évaluée par la mesure de la taille de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse (mesure faite une fois par semaine sur souris éveillée).

Le second modèle développé permettra de se rapprocher de la réalité clinique en réalisant la greffe de biopsies de tumeurs de patients atteints de mélanome. Cette procédure expérimentale sera

réalisée sur souris anesthésiées afin d'implanter sous la peau (à la base du cou) un fragment de mélanome humain. Comme précédemment, ces souris seront traitées avec les différentes combinaisons de molécules thérapeutiques.

Notre projet s'inscrit dans les recommandations de la règle des 3R. Nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* afin de valider l'efficacité de nos molécules thérapeutiques, seule ou en combinaison. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle *in vivo* intégrant la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrières limitant l'efficacité des traitements. De plus cette étude est un préalable indispensable à toute utilisation en médecine humaine. Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 1910 souris, sur une durée de 5 ans (dont 1530 subiront l'implantation chirurgicale pour la greffe de biopsies de tumeurs de patients atteints de mélanome). Nous comparerons l'efficacité thérapeutique de 6 molécules seules ou en combinaison sur des groupes de 5 souris. Une attention toute particulière sera portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduisent à l'euthanasie de la souris. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 2 mois après le début du traitement, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

14321 Le glioblastome est un cancer tumoral très résistant aux traitements actuels. L'objectif du projet est de valider les effets de champs électriques pulsés dans le traitement de cancers profonds et hautement résistants avec les nouvelles technologies bioélectroniques. En effet, ces impulsions sont déjà connues pour affecter et éradiquer un certain nombre de cancers superficiels (par exemple, de la peau), et elles ont l'avantage d'être sans douleur, sans effets secondaires connus et de cibler précisément les tissus tumoraux. Elles sont actuellement en test clinique aux Etats Unis et en Europe dans des thérapies pour soigner le mélanome humain, et des études précliniques débutent sur le carcinome hépatocellulaire. Notre but est de déterminer si les champs électriques pulsés peuvent aussi être efficaces sur des tumeurs solides *in vivo* et très résistantes aux traitements actuels classiques (type chimiothérapies et radiothérapies), pour lesquelles le pronostic vital des patients est engagé. Il est primordial de vérifier dans un premier temps que ces impulsions n'affectent pas les tissus sains ni les vaisseaux sanguins, ce qui implique de façon incontournable un passage expérimental du modèle cellulaire *in vitro* au modèle animal *in vivo*. Nous prévoyons d'utiliser une technologie d'imagerie très innovante à fluorescence et de microscopie multiphotonique *in vivo* afin de suivre l'influence de ces champs électriques pulsés sur des tumeurs murines greffées en intracrânien chez la souris (modèle syngénique). Egalement, nous utilisons des microélectrodes organiques flexibles pour éradiquer la tumeur greffée. Ainsi nous étudierons les modifications du micro-environnement tumoral, la dosimétrie, la nécrose, la mort tumorale, la taille et la vascularisation des échantillons en réponse aux traitements. Dans un souci de réduction, nous avons déjà réalisé des études préliminaires par des techniques de culture cellulaire 2D et 3D sur membrane chorio-allantoïde mimant un environnement *in vivo* de façon à limiter le nombre d'animaux et à remplacer au maximum les modèles. En l'absence de méthode de remplacement possible, il s'avère cependant nécessaire d'avoir recours au modèle animal murin dans cette étude et d'utiliser 660 jeunes souris divisées en différents sous-groupes expérimentaux selon plusieurs critères d'analyse (traitements, vascularisation, réponses moléculaires). La technique de microscopie envisagée permet le suivi de l'animal vivant, évitant sa mise à mort pour l'observation de la tumeur. Les animaux en fin d'étude seront mis à mort et le matériel biologique servira soit à des études de biologie moléculaire *in vitro*, soit à de l'histologie. Dans un but de raffinement, toutes les procédures chirurgicales seront soumises à protocole d'anesthésie par Ketamine/Xylazine associé ou non à l'isoflurane. Le Rymadil et le Carprofen sont administrés tous les deux jours

pendant les 10 premiers jours post-opératoires complétement par injection de buprénorphine en fin de chirurgie et renouvelé si besoin sur la base de la douleur détectée par nos grilles de score.

14322 Chez l'homme, les troubles anxieux regroupent divers troubles en lien avec une anxiété excessive et difficile à gérer. Ils se manifestent de façon très variable et notamment par l'apparition de troubles obsessionnels compulsifs (TOC). Ces tocs peuvent induire des obsessions, produisant de l'inconfort, des comportements répétés et ritualisés et/ou des compulsions pouvant avoir l'effet de diminuer l'anxiété.

Chez l'animal, il existe différents tests permettant d'évaluer les effets anxiolytiques des candidats médicaments. Parmi eux, le modèle d'enfouissement de billes est basé sur le fait que les rongeurs ont une tendance naturelle à enfouir les objets qui les entourent (nocifs ou inoffensifs). Cette tendance naturelle est augmentée en situation de stress. Le projet consiste à évaluer la capacité de candidats médicaments à atténuer l'anxiété chez des souris.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 1250 souris sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets anxiolytiques d'une nouvelle molécule. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, la souris est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- utilisation du comportement naturel de l'animal
- . la mise au point de procédures rigoureuses
- . la formation du personnel
- . un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- . le suivi d'éventuels signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

14323 Chaque année, 41 millions de personnes décèdent des conséquences de maladies chroniques, également appelées maladies non transmissibles (obésité, diabète, asthme, cancer, ...), ce qui représente 71% des décès dans le monde. L'augmentation de l'incidence de ce type de maladie est entre autres associée à une mauvaise alimentation. Il apparaît aujourd'hui essentiel d'identifier de nouvelles solutions permettant le dépistage et le traitement des maladies chroniques. Ces dernières tendent également à être de longue durée et résultent de l'association combinée de facteurs génétiques, physiologiques, comportementaux et environnementaux (Source : Organisation Mondiale de la Santé) dont l'environnement microbien.

Le microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes vivant au sein des intestins d'animaux. Ces micro-organismes forment une association intime, durable et à bénéfice mutuel avec l'hôte que l'on qualifie de symbiose. Depuis plusieurs années, de nombreux travaux scientifiques ont décrit une composition différant de la composition habituelle (dysbiose) du microbiote intestinal chez les patients atteints de maladies chroniques. Récemment notre équipe a montré que ce déséquilibre résulte d'une altération de la symbiose hôte-microbiote, elle-même caractérisée par une modification de la composition du microbiote couplée à la perturbation du statut immuno-physiologique de l'hôte qui conduit à la mise en place d'états « pré-pathologiques » et/ou pathologiques. Nos travaux suggèrent que cette dysbiose résulte d'une rupture du dialogue

hôte/microbiote due à des signaux inducteurs notamment d'origines nutritionnelles. Des caractéristiques de ce déséquilibre, récurrents dans différentes maladies chroniques, ont été décrits chez la souris et l'Homme. Ils comprennent la diminution de la richesse du microbiote en termes d'espèces et de fonctionnalités avec notamment des proportions plus faibles de bactéries productrices d'acides gras volatiles tel que le butyrate, souvent associées à des proportions plus fortes de bactéries pro-inflammatoires.

L'objectif de notre projet est d'évaluer la possibilité de rupture de la symbiose hôte-microbiote par l'utilisation d'un régime riche en graisse et en sucre qui, chez le rongeur, induit une perméabilité intestinale et une inflammation intestinale ou globale. L'objectif final de nos études est de générer des informations permettant de retarder, prévenir et/ou traiter la rupture de la symbiose dans un modèle animal avec à terme l'objectif de transposer nos connaissances acquises chez l'homme pour soigner notamment l'obésité, les troubles intestinaux ou les maladies immunes.

Actuellement, il est impossible d'induire une rupture de la symbiose hôte-microbiote intestinal sans l'apport de l'expérimentation animale car la mise en place d'interactions complexes entre l'hôte et les microorganismes qui le colonisent (même au-delà de l'intestin) ne peut pas être reproduite par la culture d'organes séparés ni par toute autre méthode alternative actuellement disponible. De plus, le modèle rongeur est le plus approprié puisqu'il présente une symbiose hôte-microbiote intestinal similaire à celle décrite chez l'homme. Nous proposons un travail sur souris où les outils méthodologiques ainsi que les modèles d'induction d'inflammation par l'alimentation sont les mieux documentés (remplacement).

Dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 250 souris sur la durée totale de notre étude. Une première procédure utilisera 3 lots de 25, 25 et 30 souris, et 2 lots contrôles de 5 souris chacun. Les animaux seront exposés à des régimes alimentaires plus ou moins riche en gras et sucres afin d'induire des modifications de la composition du microbiote durables et ainsi pouvoir mesurer les conséquences chez la souris de la détérioration du dialogue hôte-microbiote sur le long terme. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum possible sans nuire à la qualité statistique des données, en tenant compte de notre expérience dans ce domaine (réduction). Les animaux seront hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées et préservant leur bien-être. Les animaux auront à disposition tout au long de l'expérimentation des maisons en PVC, des plaques de cellulose et des bâtons de bois à ronger (raffinement). Enfin, la souffrance éventuelle des animaux est minimisée autant que possible notamment par l'utilisation de méthodes non ou faiblement invasives. Au cours de l'expérience, la plupart des analyses sont effectuées sur des échantillons fécaux. Si nécessaire, une deuxième procédure sera mise en place, et utilisera dans ce cas des lots de 25, 25, et 30 souris, et des régimes alimentaires intermédiaires à ceux utilisés dans la procédure 1. Là où la première et éventuellement la deuxième procédure utilisent des souris mâles, la troisième procédure sera effectuée avec des souris femelles dans des conditions similaires à la procédure 1 ou 2. Cette procédure générera des informations très importantes en soi (est-ce que les mêmes effets sont observés dans des animaux mâles et femelles), et ouvrira la voie à des études de transfert intergénérationnel de microbiotes altérés, et les conséquences pour la progéniture.

14324 Les vascularites (maladies inflammatoires des petits vaisseaux sanguins) connaissent des épisodes de remissions, après des périodes d'inflammation aiguë. L'inflammation chronique induite lors des vascularites affecte l'intégrité des micro-vaisseaux et entraîne une perte de fonctionnalité au niveau du rein, principalement due à une fibrose massive. De nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être envisagées car les traitements actuels (glucocorticoïdes) sont associés à une forte morbidité/mortalité.

La réaction inflammatoire est un processus complexe faisant intervenir différents types cellulaires du système immunitaire. De ce fait, l'étude de l'inflammation sur des modèles cellulaires séparés ne reflète qu'une facette des mécanismes mis en jeu. L'animal représente un système biologique complet grâce auquel on peut étudier l'interaction entre différent composant du système immunitaire. En conséquence, l'évaluation du bénéfice d'un composé pharmacologique destiné au

traitement des maladies inflammatoires et de leurs conséquences vasculaires nécessite obligatoirement le recours à l'animal.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de molécules pharmacologiques innovantes inhibant l'inflammation afin de prévenir l'insuffisance rénale lors des vascularites. Ces évaluations seront réalisées sur de souris soumis, soit à une inflammation aiguë locale, soit à une inflammation chronique rénale. Nous allons utiliser différents modèles de vascularites bien caractérisées dans la littérature:

1. Modèle de vascularite locale au niveau de la peau dorsale induite par l'injection d'immuno-complexe (antigène-anticorps)
2. Modèle de vascularite aiguë induite par une forte dose d'anticorps dirigée contre la membrane basale du glomérule (anti-GBM, anti-Glomerular Basement Membrane) (Glomérule est unité filtrant du sang dans le rein)
3. Modèle de vascularite chronique induite par une dose faible de l'anticorps anti-GBM

Des injections rétro-orbitaires, sous-cutanées ainsi que des prélèvements seront réalisées sur des animaux anesthésiés. Le modèle de vascularite locale et aiguë ont d'une durée de 4 heures et les animaux seront surveillés pendant toute la procédure. L'inflammation chronique dure jusqu'à 14 jours et les animaux sont suivis 1 fois par jour (observation, pesée). Les points limites précoces et adaptés ont été définis avec une grille de score permettant leur évaluation quotidienne afin de limiter toutes douleurs, souffrances des animaux.

Pour le modèle de vascularite chronique, l'urine est récupérée quotidiennement en cage métabolique pendant 1 heure ; le sang est récupéré 2 fois par semaine via la veine de la queue pendant 2 semaines afin de réaliser des analyses de la fonction rénale.

Pour les 3 procédures, le sang, l'urine, les reins, la peau sont récupérés après l'euthanasie pour effectuer des analyses histologiques et dosages des marqueurs inflammatoires.

Afin de réduire le nombre d'animaux, les composés pharmacologiques sont préalablement sélectionnés *in vitro*, sur des modèles cellulaires appropriés.

Le nombre d'animaux, minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement nos études du point de vue de l'analyse statistique, est calculé pour chaque étude se basant sur les données de la littérature.

Le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet de 5 ans est estimé à 2034.

Les animaux seront tous euthanasiés à la fin de chaque procédure.

14325 Les céréales, fruits secs oléagineux et les fruits séchés sont fréquemment contaminés par des moisissures qui produisent des toxines très résistantes aux conditions environnementales et aux procédés de transformation des aliments. La contamination peut survenir en cours de culture, mais également au moment des récoltes ou du stockage des denrées et est favorisée par la chaleur et l'humidité. La stabilité des toxines favorise leur persistance dans l'ensemble de la chaîne alimentaire, depuis les denrées d'origine végétale initialement contaminées, jusqu'aux produits laitiers. Parmi ces toxines, le déoxynivalénol (DON) est de loin le contaminant le plus fréquemment rencontré. Une intoxication par cette toxine induit une forte réduction de la prise alimentaire, une chute de la température corporelle et une diminution de l'activité locomotrice. Plus de 40 pays ont établi des règlements et lignes directrices concernant les niveaux de contamination en DON admissibles dans les denrées destinées à l'alimentation animale et humaine, en prenant en compte les effets sur l'appétit et la croissance mesurés chez la souris. Cependant, des données récentes montrent qu'une large proportion de la population humaine est chroniquement exposée à des doses de DON excédant les recommandations.

Des recherches menées chez la souris ont permis d'identifier les régions cérébrales impliquées dans les réponses toxiques au DON. L'apparition de ces symptômes semble liée à l'activation de zones spécifiques du cerveau et à la production par cet organe de molécules de l'inflammation, molécules qui permettent la mise en place de réponses de défense de l'organisme vis-à-vis des agressions.

La présente étude vise à préciser les mécanismes à l'origine des troubles du comportement alimentaire induits par cette mycotoxine en étudiant ces effets sur le cerveau et sur différents organes périphériques. Au niveau du cerveau, nous nous intéresserons plus particulièrement à la microglie constituée par des cellules responsables de la défense immunitaire du système nerveux. Les organes périphériques qui seront ciblés dans cette étude sont principalement : i) le tissu adipeux comme l'une des principales sources de réserve énergétique de l'organisme, ii) le foie et le rein, constituant les sites de détoxifications et d'élimination de toxines de notre organisme.

De plus, l'étude des effets de DON sur les organes périphériques permettrait de mieux comprendre les troubles métaboliques associés à l'évolution du mode de vie occidental et qui constituent un problème de santé publique majeur.

Cette étude sera effectuée sur des souris mâles de 12 semaines. Dans le cadre des 3R, l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucun modèle de substitution *in vitro*, n'utilisant pas l'animal de laboratoire, permettant l'étude des effets toxiques de DON sur le comportement alimentaire et sur les régulations du métabolisme lipidique et glucidique. Notre expertise en expérimentation animale, nous permet de définir au plus juste le nombre d'animaux nécessaires estimé à 170. Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse, les animaux sont hébergés dans des cages transparentes dont le milieu est enrichi par des cylindres et des dômes en carton. Par ailleurs, nous évaluerons la souffrance grâce à la mise en place d'un score de souffrance lors de la pesée quotidienne des animaux, afin d'administrer si nécessaire un traitement antalgique (Buprénorphine) ou sortir l'animal concerné de l'étude.

14326 Les troubles du rythme cardiaque (arythmies) sont une cause importante de morbidité et de mortalité dans les pays développés et constituent ainsi un problème de santé publique. Certaines arythmies observées peuvent être dues à une mutation génétique rare d'un canal intracellulaire qui joue un rôle essentiel dans la contraction des cellules cardiaques et du cœur dans son ensemble. Les patients porteurs de ces mutations présentent des troubles du rythme pouvant entraîner une syncope voire une mort subite. Or, les anciens médicaments anti-arythmiques se sont montrés inefficaces voire dangereux, et seuls les bêta-bloquants (qui ralentissent et renforcent les contractions cardiaques) et les défibrillateurs implantables peuvent, de façon inconstante, prévenir le décès des patients. Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'axer la recherche vers le développement de nouveaux agents thérapeutiques contre ces arythmies létales. De précédentes études ont montré que l'expression (c'est-à-dire la quantité présente dans la cellule) d'une protéine régulant le canal essentiel pour la contraction du cœur est diminuée lors d'insuffisance cardiaque, nous laissant supposer que cette diminution joue un rôle important dans le développement des arythmies. De plus, lorsque cette protéine est présente à un niveau supérieur au niveau normal (surexpression) dans les cellules cardiaques, les arythmies sont prévenues. Mais à ce jour, les mécanismes qui empêchent le développement des troubles du rythme grâce à la surexpression de cette protéine restent largement incompris.

Afin de progresser dans la compréhension de ces mécanismes et dans le but de développer de nouvelles thérapies contre certaines formes d'arythmies, nous avons créé 2 lignées de souris surexprimant la protéine d'intérêt à deux niveaux distincts. Cette surexpression, dite constitutive car permanente et n'ayant pas besoin d'être déclenchée, et spécifiquement cardiaque, améliore la fonction cardiaque mais peut entraîner une hypertrophie cardiaque (phénotype potentiellement dommageable observé lors de l'étude pilote).

Cette nouvelle étude a pour but de caractériser de manière plus extensive la structure et la fonction cardiaque de ces 2 lignées de souris au moyen de techniques d'imagerie *in vivo* non-invasives, telles que l'échocardiographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les séquences d'acquisition seront optimisées pour être adaptées à ces animaux dont certains ont une fréquence cardiaque basse et d'autres présentent une sensibilité accrue à l'anesthésie. Ce projet de caractérisation par imagerie d'un an portera sur 70 animaux âgés de 2-3 mois. Les sessions d'imagerie seront espacées de 48h minimum pour permettre un temps de récupération, et ne seront pas répétées, pour caractériser la structure et la fonction cardiaque à un temps donné. A la fin de l'imagerie, les animaux seront euthanasiés pour une analyse biochimique et histologique des tissus

(notamment cardiaques). Les modèles animaux ne peuvent être remplacés par un modèle *in vitro* ne présentant pas l'environnement cellulaire complexe et adéquat, ni par des lignées de cellules cardiaques adultes, cellules ne conservant pas un phénotype stable et ne survivant pas au-delà de 48h de mise en culture primaire. Néanmoins, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux : l'anesthésie est adaptée pour limiter la mortalité, les mêmes animaux sont étudiés en échographie et IRM, la procédure d'imagerie sera optimisée sur un petit nombre d'animaux avant d'être appliquée à tous pour garantir l'exploitabilité des résultats. Une grille de score définit les points-limites à partir desquels l'animal sera euthanasié en cas de leur atteinte. En particulier, la fréquence cardiaque et respiratoire des animaux sera mesurée. De plus, les sessions d'imagerie réalisées sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur ou angoisse chez les animaux.

14327 Le but de ce projet est de développer un vaccin universel contre la grippe à base d'ARN.

Ce projet est la continuité d'un projet Européen qui combine plusieurs partenaires pour la conception et l'évaluation préclinique d'un vaccin ARN contre la grippe.

Dans ce projet, notre rôle est de formuler l'ARN.

L'ARN utilisé code pour l'antigène hémagglutinine de la grippe H1N1.

Les animaux ne seront pas infectés par la grippe durant le projet.

Avant de pouvoir passer aux essais cliniques chez l'Homme il faut déterminer la recette de vaccin la plus efficace sur un modèle animal.

L'étude qui fait l'objet de cette demande d'autorisation a pour but de vérifier si des combinaisons de molécules développées en laboratoire et injectées dans des souris sont capables d'expression chez la souris dans les tissus pulmonaires et musculaires.

Les animaux seront anesthésiés durant la procédure. Les animaux seront surveillés quotidiennement dès leur arrivée au laboratoire avec une grille de scoring avec des points limites adaptés et prédictifs.

Les avantages liés à ce projet sont le développement d'un nouveau vaccin contre la grippe et plus particulièrement un vaccin adapté aux enfants car les enfants de moins de 10 ans sont responsables de la transmission du virus dans 30 % des cas.

De plus, il n'existe pour l'instant qu'un seul vaccin contre la grippe destinée aux enfants de 6 mois à 3 ans. Nos travaux seront menés dans le respect de la règle des 3R : l'effectif des souris mis en œuvre est limité au strict minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement.

Nous avons déjà effectué des travaux *in cellulo* préalables sur des cellules dendritiques murines traitées avec des vaccins ARN sans induction de toxicité *in cellulo*.

Les travaux chez le modèle animal sont dans la continuité de ces résultats.

Ce projet est important pour la santé humaine et permettra d'augmenter les vaccins par ARN existants.

En termes de raffinement nous utiliserons des anesthésiques pour les administrations. Les animaux seront hébergés par groupe sociaux dans des cages avec enrichissement. Nous avons mis en place des points limites adaptés et prédictifs.

Des études sur cellules isolées ont permis de sélectionner une molécule mimant le virus grippal pouvant être combinée avec 3 transporteurs chimiques différents, chacun donnant des résultats encourageant. Pour valider l'efficacité de ces combinaisons et sélectionner la meilleure formulation pour la suite des tests, il faut passer aux expérimentations *in vivo*.

Nous comparerons deux types d'ARN.

Nous aurons besoin d'utiliser 1 lot de souris par formulation et par type d'ARN avec des injections intramusculaire et intra-trachéale.

Les souris seront injectées avec les formulations ARN sous anesthésie puis nous évaluerons l'expression des antigènes et la réponse immunitaire induite par la vaccination par cytométrie en flux et tests ELISA. Comme il ne s'agit que d'injections sous anesthésie et que les animaux ne

seront pas infectés aucune douleur n'est attendue. Aucun prélèvement sur animal vivant ne sera réalisé.

Les expériences seront répétées une fois, amenant à un nombre de 140 animaux.

14328 L'objectif de ce projet est d'étudier la biodistribution d'un composé vaporisé dans l'abdomen par une méthode innovante : la PIPAC (Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy). Cette technique a été mise en oeuvre à partir de 2013 et consiste en l'administration de chimiothérapies sous forme d'aérosol, dans l'abdomen du patient par voie laparoscopique (coelioscopie) donc minimalement invasive, au bloc opératoire. La vaporisation doit améliorer la distribution des agents de chimiothérapie dans la cavité abdominale, et l'application sous pression devrait augmenter la pénétration locale de la chimiothérapie.

Elle est utilisée chez l'homme pour le traitement des carcinomes péritonéaux (présence de très nombreux foyers tumoraux qui ne peuvent pas tous être retirés par le chirurgien). Ce type de cancer disséminé est en général le signe d'une maladie très évoluée et associée à une faible survie (médiane de survie de 3 à 12 mois). La PIPAC a été mise en oeuvre de façon relativement empirique avec très peu de données disponibles dans la littérature et des effets parfois délétères chez l'homme par manque de connaissance du mode d'action et des doses de chimiothérapie à administrer par cette méthode.

L'objectif de ce projet est de mettre au point cette voie d'administration chez le rat et de caractériser l'administration par PIPAC en réalisant une imagerie scintigraphique de la biodistribution d'un composé administré par cette méthode. La biodistribution par PIPAC sera comparée à la biodistribution du même composé lorsqu'il est administré par voie intra péritonéale ou par voie intra péritonéale sous pression.

Les animaux mis en oeuvre seront exclusivement des animaux sains. La présente saisine concerne 60 rats maximum. Les dommages attendus sont liés à la réalisation d'une coelioscopie chez le rat. Tous les actes (coelioscopie et imagerie) seront réalisés sous anesthésie générale et prémédication des animaux avec un antalgique avant la coelioscopie.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R : examens d'imagerie non invasive sur animaux anesthésiés, qui ne susciteront pas de stress important à l'animal (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum avec 60 rats maximum qui seront utilisés (réduire). L'utilisation de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier qui puissent mimer le dépôt d'un composé administré par PIPAC (remplacer).

14329 Le rationnement selon les besoins en protéine métabolisable permet de piloter au plus juste les apports de protéines dans la ration des ruminants. Il est ainsi possible de limiter les apports de protéines et donc de limiter les rejets azotés (nitrates, ammoniac.) et donc la pollution de l'environnement.

Les bactéries et protozoaires ont besoin de protéines dégradables dans le rumen pour se développer. Les bactéries avec une forte activité cellulolytique ont par exemple besoin de source azotée sous la forme d'ammoniac pour se développer. Cependant un apport excédentaire de protéines dégradable dans le rumen non consommé par les microbes du rumen pour leur développement par manque d'énergie dégradable dans le rumen, elle aussi nécessaire à leur développement, est sous forme d'ammoniac dans le jus de rumen, forme finale de la dégradation des protéines par les microbes du rumen. L'excès d'ammoniac traverse la paroi ruminale et est métabolisé par le foie en urée, évacuée dans l'urine et le lait via le système sanguin.

La flore du rumen par sa diversité et les équilibres inter espèces représente un écosystème complexe que les modèles mathématiques ou *in vitro* n'arrivent pas à reproduire fidèlement. Les tests *in vivo* sur les animaux cibles sont donc nécessaires.

Le dosage de l'urée dans le lait permet d'évaluer la valorisation de la protéine au niveau ruminal et donc de piloter les apports azotés dans la ration

L'apport d'un mélange d'huiles essentielles dans la ration doit permettre théoriquement d'améliorer la valorisation de la ration au niveau ruminal et donc une amélioration de la croissance microbienne qui se traduira par une augmentation de la synthèse de protéine microbienne permettant ainsi théoriquement une réduction des apports de protéine sans conséquence sur les performances des animaux.

Cependant, la mesure du taux d'urée dans le lait est assez imprécise.

Il est nécessaire d'un point de vue scientifique de réaliser des analyses au niveau sanguin pour évaluer finement la non valorisation ruminale de la protéine. De plus, des analyses de l'urine permettront en complément d'estimer la synthèse de protéine microbienne et l'azote urinaire associé à des analyses d'azote fécal permettront également d'évaluer les rejets azotés. Il sera ainsi possible d'évaluer l'efficacité azotée de la ration des ruminants.

Les prises de sang, acte couramment réalisé en élevage, vont se limiter dans le cadre de ce projet à 36 vaches laitières. En effet, pour détecter une différence de 0.9 mmol d'urée /litre entre lot avec une variabilité de 0.75 (écart-type), une erreur de 5% et une puissance de 80%, il faut 11.9 vaches laitières par lot (fonction Power. t. test _logiciel R) x 3 lots) 36 vaches.

Pour réduire le temps de manipulation, les prises de sang sont réalisées au niveau de la queue. De plus, le nombre de prises de sang /animal est limité à 2.

Les prélèvements de sang seront réalisés dans un système de contention adapté. De plus, on respectera le comportement grégaire des animaux en les conservant par groupe de 12.

14330 Les plaquettes sanguines arrêtent les saignements suite à une lésion vasculaire, un processus physiologique que l'on appelle hémostase primaire. Un processus similaire peut survenir dans des conditions pathologiques dans une artère malade et entraîner la formation d'un thrombus occlusif qui est responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, deux problèmes majeurs de santé publique en France et dans le monde.

A ce jour, les agents anti-plaquettaires qui préviennent la thrombose artérielle, c'est-à-dire la formation d'un agrégat composé de plaquettes notamment au niveau des coronaires notamment, ne peuvent pas être utilisés dans le traitement de l'AVC en raison de la dangerosité du saignement qu'ils pourraient entraîner au niveau du cerveau.

L'identification de nouveaux médicaments antiplaquettaires prévenant la formation de thrombi et ayant très peu d'effets sur l'hémostase physiologique constituerait une nouvelle approche pour le traitement de l'AVC, par exemple. Pour les cas de thrombose artérielle, des candidats permettant une dissolution du thrombus permettrait un traitement pharmacologique sans passer par un épisode chirurgical.

Afin de limiter au maximum le risque d'effets secondaires lors du développement de nouveaux médicaments anti-thrombotiques, nous nous sommes intéressés à un récepteur exprimé uniquement sur les plaquettes sanguines.

Le but de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules candidates en thrombose expérimentale chez la souris, sans modifier l'hémostase. Ces études reposeront sur l'utilisation de différents anticorps utilisables à la fois chez la souris et chez l'homme.

Limitation du nombre d'animaux :

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer l'intérêt de cibler un récepteur spécifique des plaquettes lors de thromboses artérielles ou d'AVC. Une première partie de l'étude a été réalisée avec du sang humain en utilisant un modèle de thrombose *ex vivo*, disponible au laboratoire. Il s'agit d'un système de perfusion composé de chambres microfluidiques de petite taille couplées à un système de microscopie. Des expériences ont été réalisées à partir de sang issu d'un donneur volontaire afin de caractériser *in vitro* l'importance de différentes tailles de lésion mimées par des zones recouvertes de collagène de différentes tailles. L'utilisation de ce système s'avère toutefois insuffisant, car ce processus reste particulièrement complexe et fait intervenir plusieurs types cellulaires ainsi que des conditions hémodynamiques. Il nous semble impossible de substituer la

souris à des modèles *in vitro*. Ainsi, des expériences complémentaires nécessitant des données *in vivo* seront nécessaires et reposeront sur des modèles de thromboses expérimentales et d'AVC.

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum en évaluant le plus de fonction possible dans un même test expérimental, avec cependant la contrainte d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour chaque expérience, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de la procédure afin lutter contre l'hypothermie
- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
- Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire pendant et après chaque procédure.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 672 souris maximum.

14331 Les cancers du système digestif et du système hématopoïétique demeurent un problème majeur en Santé Publique. Leurs causes sont multiples, aboutissant à la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs et à l'activation d'oncogènes. Notre étude se focalise sur un gène homéotique codant pour un facteur de transcription exprimé sélectivement dans l'épithélium intestinal adulte chez le sujet sain. Ce gène, dont l'expression est réduite dans les cancers du côlon les plus agressifs, exerce la fonction de suppresseur de tumeurs dans l'intestin. Il constitue donc une cible thérapeutique potentielle. Cependant, une expression anormale de ce gène apparaît dans des lésions précancéreuses et cancéreuses du système digestif antérieur (œsophage, estomac, pancréas) ainsi que dans une proportion importante des leucémies. Dans ces situations pathologiques, son rôle précis reste à définir. L'objectif de ce projet est double : premièrement, étudier si la surexpression de ce gène homéotique sélectivement dans l'épithélium intestinal permet de contrecarrer la tumorigenèse dans cet organe ; deuxièmement définir l'impact de l'expression anormale de ce gène dans les cancers du système digestif antérieur et dans les leucémies. Cette étude sera réalisée chez la souris à l'aide de modèles transgéniques de gain et de perte de fonction de ce gène homéotique, associés à des modèles génétiques de cancérogenèse spontanée ou induite. Le projet a été conçu et sera mené dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Les études de physiopathologie seront nécessairement réalisées chez la souris. Néanmoins les études mécanistiques découlant des observations faites chez l'animal seront réalisées sur des modèles de cultures *ex vivo* d'organoïdes dérivés de ces souris et/ou sur des lignées cancéreuses humaines.

- Raffinement : Les animaux seront élevés dans des conditions sanitaires et de bien-être optimales. Les procédures ont été réfléchies afin de limiter au minimum l'angoisse, la douleur et la souffrance des animaux. Un suivi régulier comprenant l'observation de critères définis pour chaque protocole sera effectué. Des points limites ont été définis permettant de soustraire l'animal aux procédures expérimentales limitant ainsi la souffrance et le stress.

- Réduction : Les protocoles ont été élaborés de façon à utiliser le moins de souris possible. Ainsi, dans plusieurs procédures les mêmes souris seront utilisées pour les études dans plusieurs organes (intestin, estomac, œsophage, pancréas). De plus, le maintien des souches de souris correspondant à des modèles de cancérogenèse spontanée ou induite sera géré de façon globale avec les autres projets en cours au laboratoire utilisant ces souris. Le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure a été défini sur la base de la littérature et de façon à permettre

des analyses statistiques (Log-rank test, test de Student, test de Wilcoxon-Mann-Whitney). Au maximum, la réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 1390 souris pour 5 années d'étude.